IdentificaciÃ³n de algunas cepas de hongos micorrÃcicos asociados al kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst ex Chiov) Morrone) y su efecto en algunas variables agronÃ³micas

A Ortiz Acevedo, M Medina Sierra y J Echeverri GÃ³mez

Grupo de InvestigaciÃ³n en Ciencias Agrarias (GRICA), Escuela de ProducciÃ³n Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21, MedellÃn, Colombia.
alejo0619@gmail.com

Resumen

Se evaluÃ³ el efecto de la asociaciÃ³n de dos hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) asociados naturalmente al pasto kikuyo (nativo 1 y nativo 2) y una cepa de hongos introducida (*Rhizophagus manihotis*) bajo diferentes niveles de fertilizaciÃ³n. Las especies nativas fueron identificadas mediante las claves taxonÃ³micas descritas por el “International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi”. Los niveles de nitrÃ³geno utilizados fueron 0, 100, 200 y 400 kg/ha/aÃ±o y los niveles de fÃ³sforo fueron 0, 50, 100 y 200 kg/ha/aÃ±o respectivamente. Los tratamientos evaluados fueron sin micorrizas, con HFMA nativo 1, con HFMA nativo 2 y con *Rhizophagus manihotis*. Se evaluaron las variables de producciÃ³n de materia seca, relaciÃ³n tallo hoja y altura de la planta en tres cortes. Para evaluar las variables se utilizÃ³ un diseÃ±o experimental aleatorizado mediante un arreglo factorial (4x4x4).

En este trabajo se encontraron dos especies nativas de HFMA (*Rhizophagus intrarradices* y *Rhizophagus fasciculatus*) en potreros de pasto kikuyo de algunas provincias de Antioquia, Colombia. Se encontrÃ³ un efecto significativo (P<0,05) en las variables de altura de la planta y producciÃ³n de materia seca cuando se conjugaron todos los niveles de N, P y HFMA. Para la variable agronÃ³mica relaciÃ³n hoja/tallo hubo un efecto significativo en todos los tratamientos. Sin embargo, mediante un anÃ¡lisis canÃ³nico discriminativo se encontrÃ³ que los tratamientos que involucran dosis intermedias de N y P (100 y 50 kg/ha/aÃ±o, respectivamente), y el HFMA *R. fasciculatus*, no son necesarios para mejorar las variables de crecimiento evaluadas. El empleo de las cepas *R. intrarradices* y *R. manihotis* junto con una buena nutriciÃ³n vegetal, es Ãºtil para mejorar algunas variables agronÃ³micas en el pasto kikuyo. Una buena nutriciÃ³n vegetal debe contemplar los niveles de N y P.

Palabras clave: *altura de planta, fÃ³sforo, nitrÃ³geno, relaciÃ³n hoja:tallo*

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

Abstract

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

In this study, two native species of AMF (*Rhizophagus intrarradices* and *Rhizophagus fasciculatus*) were found in kikuyu pastures of some provinces of Antioquia, Colombia. Plant height and dry matter production variables showed a significant effect (P <05) when all levels of N, P, and AMF were evaluated together. The agronomic variable leaf: stem ratio had a significant effect on all treatments. However, when a discriminative canonical analysis was performed it was found that treatments involving intermediate doses of N and P (100 and 50 kg/ha/year, respectively) and including *R fasciculatus* were not required to improve evaluated growth variables. The use of *R intrarradices* and *R manihotis* strains accompanied with a good plant nutrition, it is useful to improve some agronomic variables in the kikuyu grass. A proper plant nutrition should take into account the levels of N and P.

Keywords: *leaf:steam ratio, nitrogen, phosphorus, plant height*

IntroducciÃ³n

La rizosfera es el volumen de suelo que se encuentra bajo la influencia de la raÃz de la planta (Hiltner 1904). Esta porciÃ³n del suelo se caracteriza por presentar una elevada poblaciÃ³n de microorganismos los cuales contribuyen a la entrega de nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta y esta a su vez produce exudados fotosintÃ©ticos que sirven como fuente de alimento para estas poblaciones de microrganismos (Burdman et al 2000). Los microorganismos presentes en la rizosfera pueden representar para la planta algÃºn tipo de beneficio, daÃ±o o incluso puede influir significativamente en el crecimiento y desarrollo de la planta (Adesemoye y Kloepper 2009; Ahmad et al 2011; Lau y Lennon 2011). Algunos de los microorganismos que colonizan la raÃ-z y que se encuentran en la rizosfera son los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) los cuales mejoran el crecimiento y desarrollo de la planta mediante la translocaciÃ³n de nutrientes de las zonas donde las raÃces de la planta no los pueden tomar (Gray y Smith 2005). El pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov) Morrone) es la gramÃnea perenne mÃ¡s comÃºn y mejor adaptada a zonas de clima frÃo en Colombia (Estrada 2001). Esta gramÃnea juega un papel importante en la alimentaciÃ³n animal, debido a que es una especie de una alta tasa de incremento de biomasa, presenta un sistema radicular bien desarrollado y buenas propiedades nutritivas dentro de las que se destacan el alto contenido de proteÃna de alta digestibilidad y contenido de fibra (Butler y Bailey 1973; Marais 2001). Este pasto tiene una oferta forrajera elevada favorecida por la fertilizaciÃ³n, lo cual mejora el consumo de materia seca y por tanto, la producciÃ³n de leche de las vaca (Carulla et al 2004; Bargo et al 2003) en las zonas de trÃ³pico alto de Colombia donde se encuentra establecido. Sin embargo, el tipo de fertilizante y las caracterÃsticas del suelo limitan la absorciÃ³n de nutrientes y la calidad de forraje (Correa et al 2008), por tanto, es de vital importancia el conocimiento de los microorganismos que se asocian con el pasto kikuyo, los cuales favorecen la toma de nutrientes, el desarrollo y crecimiento del pasto, mediante una disminuciÃ³n de los niveles

de aplicaciÃ³n de fertilizantes quÃmicos. El objetivo de este estudio fue identificar algunos HFMA asociados a praderas de kikuyo en algunos municipios de la regiÃ³n alta de Antioquia, Colombia y evaluar como es el rendimiento a travÃ©s de algunas variables agronÃ³micas de los HFMA con diferentes aplicaciones de fertilizantes nitrogenados y fosfÃ³ricos.

Materiales y mÃ©todos

Sitio de estudio

El experimento se desarrollÃ³ bajo condiciones de casa malla en el corregimiento de San CristÃ³bal municipio, MedellÃn, Colombia a una altura 1.860 msnm, con una temperatura promedio de 21Â°C, la precipitaciÃ³n promedia anual de 1.575 mm y coordenadas (N: 06Â°16.913Â´ W: 075Â° 37.62Â´).

Muestreo de suelos

Se seleccionaron muestras de suelo y pasto de cuatro zonas representativas por la producciÃ³n de leche bajo pasto kikuyo en los municipios de San Pedro de los Milagros, EntrerrÃos, Santa Rosa de Osos y La UniÃ³n departamento de Antioquia Colombia. De la muestra se extrajo el suelo rizosfÃ©rico para la identificaciÃ³n de las esporas de los HFMA, tomando los primeros 20 cm de suelo donde se encuentra la mayor parte de los microorganismos del suelo que forman algÃºn tipo de simbiosis con las raÃces de la planta (Barea et al 2005; Chopra et al 2007). Con el fin de evitar errores en las esporas seleccionadas como nativas de estos suelos, la muestra se tomÃ³ de lotes que no estuvieron bajo ningÃºn manejo agronÃ³mico, cercanos a bosques y donde el pasto kikuyo mostrÃ³ un buen crecimiento. Cada muestra fue de 5 kg de suelo de cada uno de los sitios de muestreo (tres fincas por municipio), estas fueron llevadas al laboratorio de suelos en la Universidad Nacional sede MedellÃn y al laboratorio de pastos y forrajes de la Universidad de Antioquia para el anÃ¡lisis de suelos y la extracciÃ³n de los HFMA, respectivamente.

ExtracciÃ³n de cepas de hongos formadores de micorrizas arbusculares del suelo

Para la extracciÃ³n de las micorrizas se empleÃ³ el suelo rizosfÃ©rico (Dodd y Thomson 1994). Cantidades de 100 a 200 g de suelo seco se pasaron a travÃ©s de un tamiz de dos mm y luego fueron transferidas a un “beaker” con un litro de agua destilada para humedecerlas durante 30 minutos antes de extraer las esporas; la muestra con agua se agitÃ³ durante una hora, con la finalidad de liberar las esporas en los agregados del suelo (Habte y Osorio 2001). La suspensiÃ³n de suelo se pasÃ³ sobre una serie de tamices de las siguientes dimensiones (120, 106, 80, 63 y 53 Âµm), agrupados en pila de mayor a menor malla de arriba hacia abajo, quedando en la parte inferior el tamiz mÃ¡s fino; el material que quedÃ³ en cada uno de los tamices se transfiriÃ³ a tubos falcon, llenando el restante del tubo con agua de grifo; las muestras se centrifugaron por tres minutos a 2000 rpm. Las esporas se sedimentan en el fondo del tubo, el material restante queda en suspensiÃ³n; este material que es el sobrenadante se eliminÃ³ y luego se agregÃ³ una soluciÃ³n del 50% de sacarosa, y se centrifugÃ³ nuevamente a 2000 rpm durante tres minutos. De esta manera, las esporas quedaron en el sobrenadante y algunas esporas en suspensiÃ³n y para separarlas de la soluciÃ³n se pasaron por papel filtro, luego se lavaron con agua destilada para eliminar la sacarosa. Finalmente se almacenaron en tubos de ensayo con agua destilada durante 24 horas con la finalidad de superar el choque osmÃ³tico (INVAM 2015).

SeparaciÃ³n de morfotipos nativos

En el paso siguiente las esporas fueron transferidas a cajas de Petri para despuÃ©s visualizarlas en

estereomicroscopio, allÃ fueron separadas morfolÃ³gicamente usando los siguientes criterios: tamaÃ±o de la espora, color, textura de la superficie, configuraciÃ³n de la pared de la espora y anatomÃa de la espora (Sylvia 1999). Luego de agrupar los morfotipos por las caracterÃsticas comunes, se procediÃ³ a su multiplicaciÃ³n para posterior identificaciÃ³n mediante la metodologÃa propuesta por el “The International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi” (INVAM 2015) y el European Bank of Glomales (BEG 2015).

TinciÃ³n de raÃces y determinaciÃ³n del porcentaje de colonizaciÃ³n

El mÃ©todo utilizado para este procedimiento fue el propuesto por Phillips y Hayman (1970) and Sieverding (1984), el cual requiere el montaje de raÃces teÃ±idas en portaobjetos para ser evaluadas en microscopio Ã³ptico. La tinciÃ³n de raÃces se realizÃ³ a travÃ©s de los siguientes pasos: a) clareo, b) blanqueo, c) acidificaciÃ³n, d) tinciÃ³n y e) decoloraciÃ³n. El porcentaje de colonizaciÃ³n se midiÃ³ a partir de 10 fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud de raÃz teÃ±ida, seleccionados al azar; se registrÃ³ la presencia de estructuras propias de HFMA por cada campo Ã³ptico de observaciÃ³n microscÃ³pica, con un aumento equivalente a 400X. La tinciÃ³n de raÃces se realizÃ³ en el laboratorio de pastos y forrajes de la Universidad de Antioquia, a travÃ©s del siguiente protocolo:

1. Las raÃces se fraccionaron en trozos de aproximadamente dos o un cm de longitud (se utilizaron las raÃces delgadas y medianamente gruesas).

2. En un beaker se colocaron por lo menos 25 secciones de raÃces por cada muestra y se lavaron con agua corriente hasta sacar todo el suelo adherido.

3. Las raÃces se cubrieron con AFA (Alcohol 70% (90ml) formol al 37% (5ml) Ã•cido acÃ©tico glacial (5ml) durante 10 minutos y luego se lavaron dos veces con agua corriente.

4. Las raÃces de kikuyo se colocaron en una soluciÃ³n de KOH al 10%, las cuales se calentaron al baÃ±o de marÃa por 5-20 minutos antes de llevarlas al autoclave para decolorarlas (extracciÃ³n de taninos). Se estableciÃ³ un tiempo de 6 minutos para raÃces de este pasto.

5. Se dejÃ³ enfriar y se lavÃ³ dos veces con agua destilada.

6. Se agregÃ³ HCl al 1% y se dejÃ³ por 5 minutos (para neutralizar el efecto de la base).

7. Las raÃces se lavaron dos veces con agua corriente, y luego se les adicionÃ³ azul de tripÃ¡n al 0,050%, dejÃ¡ndolo actuar de 4- 8 horas.

8. Para el proceso de decoloraciÃ³n de las raÃces se les adicionÃ³ lactoglicerol dejando actuar por varias horas.

El porcentaje de colonizaciÃ³n se determinÃ³ a partir de la siguiente fÃ³rmula:

El nÃºmero mÃnimo de intersecciones observadas fue de 100 (Giovannetti and Mosse 1980).

MultiplicaciÃ³n de cepas

Se usÃ³ como medio de cultivo para la esporulaciÃ³n el kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst ex Chiov) Morrone), con el objetivo de que se multiplicaran las esporas de los HFMA que formaron simbiosis con este pasto. El sustrato que se usÃ³ fue una mezcla entre cuarzo, vermiculita y caolinita en proporciÃ³n 2:1:0,5 respectivamente desinfectada en autoclave (Molina 2008) a 120 ÂºC durante 15 minutos. La multiplicaciÃ³n de las esporas se realizÃ³ en potes plÃ¡sticos con orificios en la parte inferior para permitir la salida de agua (Habte y Osorio 2001). El pasto se dejÃ³ crecer durante ocho semanas (Knapp et al 2012); cada pote fue fertilizado con 80 ppm de P usando como fuente roca fosfÃ³rica; luego de la 8 semana se disminuyÃ³ la aplicaciÃ³n de agua hasta dejar el suelo con un contenido de humedad alrededor del 5% o menos; despuÃ©s la planta se cortÃ³ dejando solamente el suelo con las esporas de los HFMA y raÃces de la planta (Habte y Osorio 2001).

Pasto kikuyo

Se obtuvo semilla sexual de pasto kikuyo maduro de los lotes de las fincas donde se seleccionaron las muestras de suelo; estas semillas se usaron para multiplicar las esporas de los HFMA y para montar el ensayo objetivo del estudio. La siembra se realizÃ³ en potes plÃ¡sticos de dimensiones de 16 cm de alto x 8 cm de diÃ¡metro, previamente esterilizados en autoclave a 120ÂºC durante 15 minutos, los cuales contenÃan suelo tomado de los diferentes municipios, donde se colocaron 5 semillas sexuales de pasto kikuyo y cuatro gramos de inoculÃ³ de cada una las cepas de los hongos que hacen parte del estudio con las dosis de fertilizante segÃºn los tratamientos.

FertilizaciÃ³n nitrogenada, fosfÃ³rica y HFMA

Para la fertilizaciÃ³n nitrogenada de 100% se empleÃ³ la mÃ¡xima dosis reportada por Dianelis et al (1994) de 400 kg N/ha/aÃ±o o 50 kg N/ha/aÃ±o/corte en pasto kikuyo, usando como fuente urea grado (4600); el 100% de la dosis del fertilizante fosfÃ³rico fue 200 kg P/ha/aÃ±o o 25 kg P/ha/corte (Dianelis et al 1994), usando como fuente roca fosfÃ³rica (31,59% P_2O_5 y 39,34% CaO. Se ajustÃ³ la dosis de cada elemento por hectÃ¡rea al Ã¡rea de cada unidad experimental, cada elemento se aplicÃ³ 10 dÃas posteriores a la siembra y despuÃ©s de cada corte. Los HFMA empleados fueron nativo 1 (*Rhizophagus intrarradices*), nativo 2 (*Rhizophagus fasciculatus*) y la cepa conocida (*Rhizophagus manihotis*).

El pasto se estableciÃ³ en suelo extraÃdo de los diferentes predios establecidos en pasto kikuyo, el cual fue esterilizado en autoclave a 120 ÂºC durante 15 minutos. Este suelo se caracterizÃ³ por presentar un bajo pH, alta cantidad de Al, baja cantidad de Ca y P (Tabla 1), antes del establecimiento del pasto en este suelo se le aplicÃ³ a cada pote cal dolomita a razÃ³n de 2000 kg/ha.

Cada 35 dÃas cuando se la cuarta y quinta hojas estaban bien desarrolladas, el pasto se cosechÃ³ a una altura de 10 cm (Mendo et al 2000; Chopra et al 2007; Swanepoel et al 2013).

Tabla 1. Propiedades fÃsico quÃmicas bÃ¡sicas del suelo usado para el ensayo

ParÃ¡metro	Unidad	Valor

Arena	g/kg	68
Limo	g/kg	10
Arcilla	g/kg	22
Clase		FArA
pH		4,5
Materia OrgÃ¡nica	g/kg	14
Al	cmolc/kg/suelo	1,6
Ca	cmolc/kg/suelo	0,57
Mg	cmolc/kg/suelo	0,25
K	cmolc/kg/suelo	0,22
P	mg/kg	5
S	mg/kg	3
Fe	mg/kg	576
Mn	mg/kg	5
Cu	mg/kg	1
Zn	mg/kg	3
B	mg/kg	0,61

$N\text{-}NO_3$	mg/kg	55
$N\text{-}NO_4$	mg/kg	43

Variables y procedimiento

En el pasto se determinÃ³ el porcentaje de materia seca segÃºn (AOAC, 1990) y producciÃ³n de este por mediÃ³ de aforos de cada uno de los potes (Estrada, 2001), la altura de la planta (alt 1, alt 2, alt 3, alt 4, alt 5, alt 6), estÃ¡ se midiÃ³ en centÃmetros, seleccionando tres plantas y midiÃ©ndolas con una regla de centÃmetros desde suelo hasta el punto mÃ¡s alto de la hoja bandera cada 15 dÃas (Toledo, 1982) y la relaciÃ³n hojas/tallos (RHT1, RHT 2), que se determinÃ³ separando el material de hojas y tallos cortado en cada pote cada 35 dÃas, depositando cada componente en su respectiva bolsa de papel con su informaciÃ³n (tallos u hojas, muestra NÂ°, tratamiento y repeticiÃ³n) y pesÃ¡ndolo en verde.

DiseÃ±o experimental

Se empleÃ³ un diseÃ±o completamente aleatorizado con arreglo factorial (4x4x4) con medidas repetidas en el tiempo. Los factores evaluados fueron fertilizaciÃ³n fosfÃ³rica (0%, 25%, 50%,100%); fertilizaciÃ³n nitrogenada (0%, 25%, 50%,100%) y hongos micorrÃcicos (sin micorrizas, dos cepas de hongos nativas y una cepa de hongo conocida), para un total 64 tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento. Las unidades experimentales consistieron en potes de plÃ¡stico de dimensiones de 16 cm de alto x 8 cm de diÃ¡metro, en los cuales se estableciÃ³ pasto kikuyo (*Chenchrus clandestinum* (Hochst. ex Chiov.) Morrone) obtenido a partir de semilla sexual de los predios en los cuales fueron tomadas las muestras de suelo. Cada unidad experimental tuvo como sustrato para el crecimiento del pasto suelo esterilizado de las zonas donde se buscaron las esporas nativas.

Se evaluaron las variables producciÃ³n de materia seca, y variables de crecimiento, como relaciÃ³n hojas/tallos, altura de las plantas en cada corte. Se incorporÃ³ la tÃ©cnica MANOVA con contraste canÃ³nico ortogonal determinando vÃa mÃ¡xima verosimilitud para la comparaciÃ³n del efecto de los tratamientos.

Modelo estadÃstico

El modelo estadÃstico que describiÃ³ las variables de respuesta fue:

Donde

Y_{ijkl} = Variable de respuesta (producciÃ³n de materia seca, relaciÃ³n hoja tallo o altura de la planta en el pasto kikuyo) en la l-Ã©sima observaciÃ³n correspondiente al efecto i-Ã©simo nivel del fÃ³sforo, j-Ã©simo nivel de nitrÃ³geno y k-Ã©simo categorÃa de hongos formadores de micorrizas

U= Media poblacional

Pi= i-Ã©sima observaciÃ³n del efecto del fÃ³sforo

Nj= j-Ã©sima observaciÃ³n del efecto del nitrÃ³geno

HMFAk = k-Ã©sima observaciÃ³n del efecto de los hongos formadores de micorrizas

P*Nij: efecto de la ij-Ã©sima interacciÃ³n de fÃ³sforo y nitrÃ³geno

P*HFMAik = efecto de la ik-esima interacciÃ³n de fÃ³sforo con los hongos formadores de micorrizas

N*HFMAjk = efecto de jk-esima interacciÃ³n del nitrÃ³geno con los hongos formadores de micorrizas

P*N*HFMAijk = efecto de la interacciÃ³n de fÃ³sforo, nitrÃ³geno y los hongos formadores de micorrizas

e(ijkl)= Error experimental

Resultados

Densidad de esporas en diferentes suelos establecidos en pasto kikuyo

Se seleccionaron tres lotes establecidos en pasto kikuyo en cuatro municipios localizados en trÃ³pico de altura en Antioquia, Colombia. En la determinaciÃ³n de la densidad de esporas se obtuvo promedios entre 74 y 87 esporas/100 g de suelo y porcentajes promedios de colonizaciÃ³n de 34% y 45%. El municipio donde se encontrÃ³ mayor nÃºmero de espora fue Santa rosa de Osos y en el que se hallÃ³ mayor porcentaje de colonizaciÃ³n fue EntrerrÃos (Tabla 2).

Tabla 2. NÃºmero de esporas y porcentaje de colonizaciÃ³n hallados en diferentes municipios establecidos en pasto kikuyo

Municipio	Esporas[a]	ColonizaciÃ³n[b]
San Pedro de los Milagros	73.7 Â± 10.7	37.7 % Â± 11.5
EntrerrÃos	78.8Â± 20.5	45.0 % Â± 4.7
Santa Rosa de Osos	87.0 Â± 13.5	36.9 % Â± 15.0
La UniÃ³n	79.0 Â± 13.6	33.8 % Â± 13.6

[a] NÃºmero de esporas en 100 gramos de suelo
[b] Porcentaje de colonizaciÃ³n (Giovannetti and Mosse 1980).

IdentificaciÃ³n de esporas

Se analizaron las caracterÃsticas de las esporas nativas encontradas en los diferentes suelos establecidos en pasto kikuyo y se compararon con las descritas en el INVAM (*International Culture*

Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi) y el BEG (*The International Bank of Glomeromycota*). Para este estudio se seleccionaron las dos especies que fueron mÃ¡s comunes en diferentes suelos, las caracterÃsticas de las especies nativa 1 y nativa 2 se describen en la Figuras 1 y 2, respectivamente.

Figura 1. Espora nativa 1

Imagen 2(a). Espora que se observÃ³ de color amarillo marrÃ³n en un aumento de 40x, de forma globosa, subglobosa, se presentÃ³ con mayor distribuciÃ³n en los tamices de 80 Âµm. Estas esporas presentan tres paredes L1, L2 y L3, las cuales a medida que la espora aumenta la edad estas se van degradando y adquiriendo un aspecto granular y un poco irregular como la que se observa en la imagen. Imagen 2(b). En las cÃ©lulas corticales de la raÃz de plantas como gramÃneas y leguminosas se forma una mancha oscura al realizar tinciÃ³n con azul de tripÃ¡n, las cuales son vesÃculas o esporas (1), que se forman cerca al punto de entrada de las hifas a estas cÃ©lulas. CaracterÃsticas que permiten clasificar la especie como *Rhizophagus intraradices* (INVAM 2015; BEG 2015; Schenck y Sm 1982).

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

Esporas caracterizadas por su variaciÃ³n de color amarillo pÃ¡lido a amarillo pÃ¡lido marrÃ³n, tamaÃ±o distribuido en mayor nÃºmero entre 83 y 110 Âµm, con forma globosa a subglobosa. Imagen 3(b). Espora con tres paredes L1, L2 y L3. La pared L1 es delgada y estÃ¡ en contacto con el ambiente que rodea la espora, L2 es de color amarillo pÃ¡lido en Polyvinyl alcohol Lactic acid glicerol (PVLG), estas dos paredes son claramente definidas y la pared L3 es una capa delgada y flexible, imagen que tambiÃ©n deja ver claramente la hifa formando un tabique a partir de la pared L1. Las anteriores caracterÃsticas son similares a las reportas por (INVAM, 2015), que permiten describir la especie como *Rhizophagus fasciculatus* (INVAM 2015; BEG 2015; Blaszkowski et al 2002).

Altura de la planta y relaciÃ³n hoja/tallo

La altura de la planta tuvo diferencias altamente significativas (P<0,01), para los tratamientos en los que se combinaron los niveles de N, P y HFMA cuando se determinÃ³ la altura 6 (alt 6) (Tabla 3), para la relaciÃ³n hoja/tallo no hubo diferencias significativas (P>0,05) en la primera medida RHT1, pero fue altamente significativa (P<0,01) para la segunda medida de relaciÃ³n hoja tallo RHT2; en todos los tratamientos, excepto los tratamientos con el efecto simple del P, donde esta variable fue significativa (P<0,05). De acuerdo con los coeficientes de correlaciÃ³n parcial para las variables dependientes en estudio (Tabla 4), no existiÃ³ correlaciÃ³n (P>0,05) entre las variables alt 5, alt 6, RHT1, RHT2, MS y Toneladas de MS/ha. Por tanto, estas son las medidas que se tienen en cuenta para el anÃ¡lisis de las variables dependientes altura de la planta y relaciÃ³n hoja/tallo.

Tabla 3. Cuadrados medio para cada una de las variables agronÃ³micas determinadas en pasto kikuyo

Fuente de variaciÃ³n	DF	Type III SS	CM alt 1	CM alt 2	CM alt 3	CM alt 4	CM alt 5	CM alt 6	CM RHT 1	CM RHT 2	CM % MS	CM TonMSxha

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

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

Tabla 4. Coeficiente de correlaciÃ³n para el error de las variables dependientes altura de la planta, relaciÃ³n hoja tallo y producciÃ³n de materia seca.

	alt 1	***alt 2***	***alt 3***	***alt 4***	***alt 5***	***alt 6***	***RHT 1***	***RHT 2***	***% MS***	***Ton***
alt 1	1	0.7**	0.4**	0.3**	0	0.1	0.1	0.1**	0.1	
alt 2	0.7**	1	0.5**	0.5**	0	0.	0.1	0.2	0.1	
alt 3	0.4**	0.5**	1	1**	0.1	0.1	0	0.2	0	
alt 4	0.3	0.5**	1**	1	0.2	0.1	0	0.2*	0	

alt 5	0	0	0	0.2	1	0.3	0	0.1	0.1	0
alt 6	0.1	0	0.1	0	0.3**	1	0.1	0.1	0.1	0
RTH 1	0.1	0	0	0	0	0.1	1	0.1	0.1	0
RTH 2	0.1	0.2	0.2*	0.2*	0.1	0.1	0.1	1	0.1	0
% MS	0.1	0.1	0	0.1	0	0.1	0.1	0.1	1	
Ton MS/ha	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0	0.1	0.2*	0.1	

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

AnÃ¡lisis canÃ³nico discriminativo

A partir del anÃ¡lisis canÃ³nico discriminativo se predijo las correlaciones entre las variables dependientes de crecimiento y producciÃ³n del pasto con los variables independientes niveles de N, P y HFMA (Figura 3); anÃ¡lisis que permitiÃ³ seleccionar los mejores niveles de los tratamientos. De acuerdo a la interacciÃ³n mÃºltiple de las tres variables independientes, los niveles de los tratamientos N 25%, P $_2O_5$ 25% y *Rhizophagus fasciculatus* no explicaron las variables de crecimiento y producciÃ³n de pasto kikuyo en el estudio, cuando se compararon con los demÃ¡s niveles de los tratamientos; ademÃ¡s, los niveles de fertilizaciÃ³n del 25% (100 kg N ha/aÃ±o y 50 kg P_2O_5/ha/corte) no fueron los mÃ¡s comunes para la fertilizaciÃ³n del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum* Hochst ex Chiov) Morrone (Dianelis et al 1994). Para los niveles HFMA nativa 2 (*Rhizophagus fasciculatus*) no tuvo el mismo efecto en todas las interacciones con respecto al nivel de HFMA nativa 1 (*Rhizophagus intraradices*), por tanto, el nivel de nativa 2 del tratamiento HFMA no se tuvo en cuenta para el anÃ¡lisis de las variables de calidad del pasto.

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

Figura 3. Mejores niveles segÃºn anÃ¡lisis canÃ³nico para el tratamiento de la interacciÃ³n de todos los niv nitrÃ³geno (N) y fÃ³sforo (P_2O_5).

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.
Niveles para N: 1- 0%, 2- 25%, 3 – 50%, 4- 100%
Niveles para P_2O_5: 1- 0%, 2 – 25%, 3 – 50%, 4 – 100%

Altura de la planta

Las medidas de altura 2 y 6 explicaron la variable altura de la planta (P< 0,05); para ambas alturas

se determinÃ³ su relaciÃ³n para encontrar los mejores niveles de tratamientos (Figura 4).

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

Figura 4. Mejores niveles para la interacciÃ³n de todos los niveles de tratamientos HFMA (M), nitrÃ³geno (dependientes altura 2 (Alt 2) y altura 6 (Alt 6), en cÃrculo rojo los tratamientos con mejores medidas en am

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.
Niveles para N: 1- 0%, 2- 25%, 3 – 50%, 4- 100%
Niveles para P_2O_5: 1- 0%, 2 – 25%, 3 – 50%, 4 – 100%

RelaciÃ³n hoja/tallo y producciÃ³n de materia seca

Se comparÃ³ la relaciÃ³n hoja/tallo con la producciÃ³n de materia seca (MS), la RHT 1 versus la producciÃ³n de MS/ha/aÃ±o (Figura 5) y la RHT 2 con el contenido de MS (Figura 6); fueron las relaciones que permitieron observar los mejores niveles de los tratamientos para las variables de crecimiento y producciÃ³n del pasto kikuyo en estudio.

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

Figura 5. Mejores niveles para la interacciÃ³n de todos los niveles de tratamientos HFMA (M), nitrÃ³geno (dependientes relaciÃ³n hoja/tallo 2 (RHT2) y materia seca del pasto (MS), en cÃrculo rojo los tratamientos ambas variables.

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.
Niveles para N: 1- 0%, 2- 25%, 3 – 50%, 4- 100%
Niveles para P_2O_5: 1- 0%, 2 – 25%, 3 – 50%, 4 – 100%

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

Figura 6. Mejores niveles para la interacciÃ³n de todos los niveles de tratamientos HFMA (M), nitrÃ³geno dependientes relaciÃ³n hoja/tallo 1 (RHT1) y producciÃ³n de materia seca del pasto (MS/ha), en cÃrculo r mejores medidas en ambas variables.

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.
Niveles para N: 1- 0%, 2- 25%, 3 – 50%, 4- 100%
Niveles para P_2O_5: 1- 0%, 2 – 25%, 3 – 50%, 4 – 100%

DiscusiÃ³n

Al evaluar algunas variables de crecimiento se encontrÃ³ la importancia de combinar la fertilizaciÃ³n nitrogenada y fosfÃ³rica con la presencia de algunos microorganismos del suelo como los HFMA. Nutrientes como el N y P son limitantes para el crecimiento de la planta (Vance et al 2000); sin embargo, microorganismos como los HFMA ademÃ¡s de movilizar P tambiÃ©n movilizaron N, tal como lo indicaron estudios previos donde los HFMA podÃan movilizar hasta 32% de N disponible en la soluciÃ³n del suelo y entregarlo a la planta para todos sus procesos fisiolÃ³gicos, entre ellos el crecimiento y desarrollo de estructuras vegetativas (Leigh et al 2009). Los resultados del estudio mostraron una baja producciÃ³n de materia seca por unidad de Ã¡rea y un retraso en el crecimiento en la primera medida de relaciÃ³n hoja/tallo y la altura de la planta, pero una mejora en esta variable en los siguientes cortes. Lo anterior, es debido a que muchas plantas disminuyeron el crecimiento en la transiciÃ³n de no simbiosis a crecimiento de la planta con simbiosis (Li et al 2008; Grace et al 2009). Los HFMA pueden mejorar el crecimiento vegetal debido a que contribuyen a movilizar N y P, pero en algunos casos no lo hacen; incluso, pueden ocasionar una inhibiciÃ³n del crecimiento de la planta (Smith y Read 1997), efecto que se debe a la pÃ©rdida de carbono que sufre esta durante la simbiosis (Hart y Reader 2002). La disminuciÃ³n del crecimiento puede ser independiente del estado nutricional de la planta (Li et al 2006); sin embargo, el efecto de las tres variables independientes del estudio (HFMA, N y P) unidas afectaron significativamente el crecimiento de las plantas en las primeras medidas, lo cual se atribuyÃ³ a la transiciÃ³n de planta con simbiosis a planta sin simbiosis. En cuanto al efecto de la fertilizaciÃ³n, algunos estudios han indicado un efecto significativo del crecimiento del pasto kikuyo cuando hay aplicaciones de fertilizantes que contienen N y P (Dianelis et al 1994; Beliuchenko y Febles 1980; Soto et al 1980; Silva et al 2010), lo que quiere decir que debe existir siempre la aplicaciÃ³n de fertilizantes quÃmicos, si lo que se desea es tener una buena producciÃ³n de pasto. Para la fertilizaciÃ³n quÃmica en pasto kikuyo se debe tener en cuenta que algunos microrganismos contribuyen a que esta no tenga que ser tan elevada; dentro del estudio se encontraron especies de HFMA nativos asociados al pasto kikuyo como *Rhizophagus intraradices* y *Rhizophagus fasciculatus*, especies que tienen una amplia distribuciÃ³n mundial encontrÃ¡ndose en zonas cÃ¡lidas, desÃ©rticas y hasta en climas tropicales (Blaszkowski et al 2002; DalpÃ© 1989; Talukdar y Germida 1993; Blaszkowski y Czerniawska 2006). *R. intraradices* es una especie de HFMA que se ha encontrado en la rizosfera de pastos familiares del pasto kikuyo como es mijo perla (*Pennisetum glaucum* (L) R. Br.) (Tidjane et al 1999). Ambas especies se pueden confundir fÃ¡cilmente con especies como*Rhizophagus aggregatus,* por tanto, para una acertada clasificaciÃ³n de estas especies se requiere de pruebas moleculares (Schenck y Sm 1982). De acuerdo con los resultados obtenidos se evidenciÃ³ que la inoculaciÃ³n de HFMA de la especie *Rhizophagus intraradices* aumentÃ³ la producciÃ³n de biomasa, por tanto, afectÃ³ positivamente las variables de crecimiento del pasto. Resultados similares fueron los encontrados por Franco y Cano (2006) en el pasto buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) cuando fue evaluado con*R. Intraradices.* Otros estudios evaluaron*Rhizophagus fasciculatus* en la especie (*Pennisetum glaucum* (L) R. Br.) encontrando, que mejora significativamente la producciÃ³n de materia seca y la absorciÃ³n de nutrientes de esta planta (Mahesh et al 2010). SegÃºn los resultados reportados por otros autores dejan claro que cualquiera de las dos especies de HFMA halladas en el estudio pueden llegar a mejorar absorciÃ³n de nutrientes, por tanto, el crecimiento de la planta, pero que no hay datos del efecto de los HFMA en variables de crecimiento y productividad del pasto kikuyo.

Conclusiones

- El manejo del pasto kikuyo fertilizado con niveles de nitrÃ³geno de 0, 200 y 400 kg ha/aÃ±o en combinaciÃ³n con niveles de P_2O_5 de 0, 100 y 200 kg P_2O_5 ha/aÃ±o y HFMA *Rhizophagus intrarradices* aumentÃ³ significativamente en algunas variables agronÃ³micas.

- La aplicaciÃ³n de HFMA puede optimizar la producciÃ³n de pasto kikuyo bajo un modelo de manejo de fertilizantes quÃmicos en bajas cantidades junto con la aplicaciÃ³n de fertilizantes orgÃ¡nicos en lecherÃas de manejo intensivo del trÃ³pico alto.

- La identificaciÃ³n de la especie de HFMA asociada al pasto kikuyo en condiciones tropicales, requiere mÃ¡s estudios apoyados por la biologÃa molecular; ya que la sola observaciÃ³n de las caracterÃsticas morfolÃ³gicas de las especies halladas, puede generar confusiÃ³n con otras especies que tambiÃ©n se presentan en suelos tropicales asociados a otros tipos de pasturas.

Referencias

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

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

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

Barea M, AzcÃ³n AC, AzcÃ³n R 2005 Mycorrhizal Fungi and Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Plant Surface Microbiology. Volume 3, Article # 20. Retrieved March 20 2015 from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74051-3_20

Bargo F, Muller LD, Kolver Y and Delahoy J 2003 Invited Rewiew: production and digestiÃ³n of suplemented dairy cowa on pasture. Journal Dairy Science 86 (1): 1 – 42.

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

Beliuchenko I y Febles G 1980 Factores que afectan la estructura de pastos puros de gramÃneas. 2. Influencia de la relaciÃ³n hoja/tallo y el contenido quÃmico de los tallos. Revista Cubana de Ciencias AgrÃcolas 14(1): 167-173.

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

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

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

Butler G and Bailey R 1973 Criteria for assessing the efficiency of the fermentation process. In:

Chemistry and Biochemistry of Herbage (Ed. G. W. Butler and R. W. Bailey) 3: 33-80.

Carulla J E, CÃ¡rdenas E, SÃ¡nchez N y Riveros C 2004 Valor nutricional de los forrajes mÃ¡s usados en los sistemas de producciÃ³n lechera especializada de la zona andina colombiana; En: Eventos y AsesorÃas Agropecuarias EU (editores), *Seminario Nacional de LecherÃa Especializada*: "Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad". MedellÃn, 21 – 38 p.

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

Correa J, PabÃ³n M L y Carulla J E 2008 Valor nutricional del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst Ex Chiov.) Morrone) para la producciÃ³n de leche en Colombia (Una revisiÃ³n): I - ComposiciÃ³n quÃmica y digestibilidad ruminal y posruminal. Livestock Research for Rural Development, Volume 20, Article # 59 Retrieved March 23 2013 from http://www.lrrd.org/lrrd20/4/corra20059.htm

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

Diannelis C, Urbano Y, Arrojas I y DÃ¡vila C 1994 Efecto de la fertilizaciÃ³n en la asociaciÃ³n kikuyo-alfalfa. (Pennisetum clandestinum- Medicago sativa). ProducciÃ³n de materia seca. Altura y relaciÃ³n hoja/tallo. Zootecnia Tropical 12(2): 281-306.

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

Estrada J 2001 Pastos y forrajes para el trÃ³pico Colombiano 1 ed. Manizales (Colombia): Universidad de Caldas. 217 -317.

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

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

Grace E J, Cotsaftis O, Tester M, Smith F A and Smith S E 2009 Arbuscular mycorrhizal inhibition of growth in barley cannot be attributed to extent of colonization, fungal phosphorus uptake or effects on expression of plant phosphate genes. New Phytologist 181: 938 – 949.

Gray M J and Smith L M 2005 Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians. Journal of Wildlife Management 69:515-524.

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

Hart M N and Reader R J 2002 Host plant benefit from association with arbuscular mycorrhizal fungi: Variation due to differences in size of mycelium. Biology and Fertility of Soils 36: 357 – 366.

Hiltner L 1904 Ãœber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer BerÃ¼cksichtigung der GrÃ¼ndÃ¼ngung und Brache. Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft 98: 59-78

INVAM. (The International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi) 2015 Retrieved March 23 2015 from http://invam.wvu.edu/

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

Lau J A and Lennon J T 2011 Evolutionary ecology of plant-microbe interactions: soil microbial structure alters selection on plant traits. New Phytologist 192: 215-224.

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

Li H, Smith F A, Dickson S, Holloway R E and Smith S E 2008 Plant growth depressions in arbuscular mycorrhizal symbioses: not just caused by carbÃ³n drain? New Phytologist 178: 852 – 862.

Mahesh B, Mayura D and Paramjit J 2010 Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal bajra (*Pennisetum glaucum*) crop under salinity stress condition. Pune: Department of Botany, University of Pune 265-271 p.

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

Mendo O, PÃ©rez J, MartÃnez P, Herrera J, Mendoza G y HernÃ¡ndez A 2000 Pastoreo de kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst Ex Chiov.) Morrone) por borregos en crecimiento a diferentes asignaciÃ³n de forraje. Agrociencia 34(2): 127-134.

Molina E 1998 Encalado para la correcciÃ³n de la acidez del suelo. Centro de Investigaciones AgronÃ³micas Universidad de Costa Rica. San JosÃ© 45 p.

Phillips J M and Hayman D S 1970 Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-161.

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

Sieverding E 1984 Manual de MÃ©todos para la investigaciÃ³n de Micorriza vesiculo-arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Cali, Colombia 96 p.

Silva A, Menjivar J C, Alava C A y GÃ³mez H F 2010 Efecto de la fertilizaciÃ³n con nitrÃ³geno, fÃ³sforo y azufre sobre la recuperaciÃ³n de una pradera degradada de kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst Ex Chiov.) Morrone), en NariÃ±o, Colombia. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del suelo. Ecuador 1-10 p.

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

p.

Soto L, Laredo M y AlarcÃ³n E 1980 Digestibilidad y consumo voluntario del pasto Kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst Ex Chiov.) Morrone) en ovinos bajo fertilizaciÃ³n nitrogenada. Revista ICA 15: 79-90.

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

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

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

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

Toledo J M 1982 Manual para la evaluaciÃ³n agronÃ³mica. Red internacional de evaluaciÃ³n de pastos tropicales (RIEPT). Centro internacional de la agricultura tropical CIAT. Cali, Colombia. 168 p.

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

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

Go to top