Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

Influencia de la micorrización Vesículo-arbuscular y de Rhizobium sobre Cajanus cajan (L.) Millsp (Frijol gandul)

Tesis presentada para optar al grado de
Licenciada en Biología

Flory Ruth Pereira Pérez

1985

INFLUENCIA DE LA MICORRIZACION VESICULO-ARBUSCULAR

Y DE *Rhizobium* SOBRE *Cajanus cajan* (L.) Millsp

(FRIJOL GANDUL)

APROBADA:

José A. Sáenz Renauld., M.Sc. — Director de Tesis

María Isabel Morales Z.,M.Sc. — Miembro del Tribunal

Ana V. Lizano Mayaya., Dra. — Miembro del Tribunal

María E.Barahona de C.,Lic. — Miembro del Tribunal

Maryssia Nassar C., Lic. — Miembro del Tribunal

Flory Ruth Pereira Pérez

SUSTENTANTE

DEDICATORIA

A mis padres

A mis hermanos

AGRADECIMIENTO

Expreso mi más sincero y cordial agradecimiento

Al M.Sc José Alberto Sáenz Renauld, quien con su valiosa dirección, colaboración y consejo, hizo posible la realización del presente trabajo.

Al personal del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), en especial a los señores: Dr. Carlos Ramírez, Ing. Carlos López y al Ing. Oscar Acuña por su valiosa colaboración.

Al señor Gilberto Quesada, por su valiosa ayuda en la realización de análisis foliares.

A los miembros del Tribunal.

A todas aquellas personas que en una u otra forma colaboraron en la realización del presente trabajo.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
CONTENIDO	iv
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
MATERIALES Y METODOS	17
RESULTADOS	21
DISCUSION	30
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
RESUMEN	38
LITERATURA CITADA	40
APENDICE	53

LISTA DE CUADROS

CUADRO		PAGINA
1	Análisis físico-químico del suelo utilizado....	54
2	Altura promedio (cm) de las plantas, tomada semanalmente.....	55
3	Altura de las plantas (cm) de cada tratamiento, a las doce semanas.....	57
4	Análisis de variancia para la altura de las plantas. a-incluyendo GA y b- excluyendo GA.....	57
5	Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan), con respecto a la altura de las plantas. (excluyendo GA).....	58
6	Area foliar (cm^2), en cada tratamiento, a las 12 semanas.....	59
7	Análisis de variancia para el área foliar en cada tratamiento, a-incluyendo GA, b- excluyendo GA.....	59
8	Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan), con respecto al área foliar de las plantas. (excluyendo GA).....	61
9	Peso seco (gramos) de la parte aérea de las plantas, a las 12 semanas.....	62
10	Análisis de variancia para peso seco de la parte aérea. a-incluyendo GA, b- excluyendo GA...	62
11	Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan), con respecto al peso seco de la parte aérea. (excluyendo GA).....	64
12	Peso seco (gramos) del sistema radical, a las 12 semanas.....	65

CUADRO PAGINA

13 Análisis de variancia para el peso seco del sistema radical. a- incluyendo GA, b- excluyendo GA.... 65

14 Diferencias entre medias de tratamientos(Prueba de Duncan), con respecto al peso seco del sistema radical. (excluyendo GA)..... 67

15 Número de nódulos por planta,a las 12 semanas..... 68

16 Análisis de variancia para el número de nódulos , (incluye GA)..... 68

17 Diferencias entre medias de tratamientos(Prueba de Duncan), con respecto al número de nódulos..... 70

18 Peso seco (miligramos) de los nódulos,a las 12 semanas..... 71

19 Análisis de variancia para el peso seco de los nódulos, (incluyendo GA)..... 71

20 Diferencias entre medias de tratamientos(prueba de Duncan),con respecto al peso seco de los nódulos.. 73

21 Nitrógeno total mg/planta, a las 12 semanas..... 74

22 Análisis de variancia para el nitrógeno total,(miligramos/planta), a-incluyendo GA, b- excluyendo a GA..... 74

23 Diferencias entre medias de tratamientos(Prueba de Duncan),con respecto al nitrógeno total mg/planta, (excluyendo GA)..... 76

24 Fósforo total mg/planta, a las 12 semanas..... 77

25 Análisis de variancia para el fósforo total mg/planta, a- incluyendo GA, b- excluyendo GA..... 77

26 Diferencias entre medias de tratamientos(Prueba de Duncan), con respecto al fósforo total mg/planta , (excluyendo GA)..... 79

27 Datos evaluados en tres plantas que permanecieron durante quince días más en el invernadero..... 80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Comparación de la altura en tres de los tratamientos (G, GSE, GA), a las siete semanas.....	22
2	Comparación de la altura de cuatro tratamientos , (GM, GSE, GR, GRM), a las siete semanas.....	22
3	Fotografías de los sistemas radicales nodulados de una planta inoculada solo con Rhizobium y otra inoculada con Rhizobium y micorriza.....	23
4	Altura promedio (cm) tomada semanalmente en cada tratamiento.....	56
5	Area foliar promedio (cm^2), a las doce semanas....	60
6	Peso seco promedio (gramos) de la parte aérea , a las doce semanas.....	63
7	Peso seco promedio (gramos) de la raíz, a las doce semanas.....	66
8	Número de nódulos promedio por planta a las doce semanas.....	69
9	Peso seco promedio (miligramos) de los nódulos a las doce semanas.....	72
10	Nitrógeno total (mg/planta), a las doce semanas...	75
11	Fósforo total (mg/planta), a las doce semanas.....	78

INTRODUCCION

La escasez de alimento es uno de los más agudos problemas que enfrenta actualmente el mundo y, en especial, los países subdesarrollados; éste se agrava ante la demanda de una población en constante aumento, por lo que se hace necesario buscar nuevas fuentes , o mejorar las ya existentes , que posean un alto valor nutritivo y, que a la vez, estén al alcance económico de las mayorías.

El frijol gandul (Cajanus cajan (L.) Millsp ,también conocido como frijol de palo, es una leguminosa que ofrece un potencial excepcional en términos de utilización,ya que puede emplearse como una rica fuente de proteína y de vitaminas del complejo B (León,1968 ; CIAT,1973; Fournier,1977; Rodríguez,1978; Sinka,1978; Kay,1979) . Además presenta la ventaja de ser un cultivo de amplia adaptabilidad a suelos pobres, tolerante a plagas, a las enfermedades y a la sequía (CIAT,1973; Fournier,1977; Kay,1979) .

Pareciera importante tratar de mejorar la productividad de este cultivo,para lo cual se puede aprovechar la capacidad de asociación simbiótica con ciertos microorganismos del suelo. Desde este punto de vista es bien conocida la propiedad de las leguminosas alimenticias, de asociarse con bacterias Rhizobium, fijadoras de nitrógeno, las cuales forman nódulos característicos en las raíces ; esta asociación favorece la utilización de nitrógeno atmosférico , fijado por la bacteria,por lo que simultáneamente aumenta el contenido de proteína en la planta (Sinka,1978). También es sabido que muchas leguminosas forman, además,asociaciones con hongos micorrízicos vesículo-arbusculares (V.A.) (Asimi,et al.,1980) Esta asociación micorrízica permite la transferencia de elementos poco mó-

wiles,especialmente fósforo del suelo,en forma asimilable para la planta (CIAT,1982).

Podemos decir entonces que las leguminosas noduladas y micorrizadas presentan como elemento simbiótico biológico,uno de los mecanismos más complejos e interesantes de acción biológica para mejorar la productividad, especialmente en suelos pobres,ya que mediante la bacteria pueden utilizar el nitrógeno que se encuentra libre en la atmósfera y mediante el micobionte,tienen la posibilidad de utilizar otros elementos fundamentales como lo es el fósforo,que a su vez es deficitario en la mayoría de los suelos tropicales y subtropicales como los nuestros.

La literatura consultada sobre Cajanus cajan nos demuestra que no existe ninguna investigación sobre el efecto de esta doble asociación simbiótica en la productividad de este cultivo,por lo que resulta de interés e importancia social y económica, realizar un trabajo de investigación que trate de producir una asociación simbiótica dual de la naturaleza indicada,la cual ofrece no solo la posibilidad de una mayor productividad de las plantas,sino también la disminución en el costo de producción,al disminuir la necesidad de aplicación de abonos a base de nitrógeno y fósforo.

Esta investigación pretende realizar un primer intento para determinar si es posible producir en invernadero,la doble asociación simbiótica Rhizobium-hongo micorrizante, en plantas de frijol gandul (Cajanus cajan),para tratar de obtener de éstas,una mayor capacidad de utilización del nitrógeno y del fósforo,así como una mayor productividad (materia seca) , obteniéndose de esta forma,una planta de mayor significado alimenticio a un menor costo.

REVISION DE LITERATURA

En términos generales se define la micorriza como una asociación simbiótica entre un hongo (micobionte) y las raíces de una planta (hospedero) (Lewis, 1973; Azcon y Barea, 1980).

La estructura de las micorrizas ha sido examinada desde hace muchos años. Según Marks y Kozlowski (1973), las primeras observaciones fueron hechas por Unger en 1840. Trappe y Fogel (1978) mencionan que Vittadini en el año 1842 propuso que las raicillas de los árboles eran nutridas por cierto micelio el cual las cubría. Sin embargo fue Frank (1885) quien propuso la teoría de una simbiosis mutualista, y dio al órgano formado por la raíz y el hongo el nombre de micorriza.

Esta asociación micorrízica desempeña un importante papel en ecología y nutrición vegetal. La planta suministra al hongo fuentes de carbono producto de la fotosíntesis (Ho y Trappe, 1973 ; Azcon y Barea, 1980; CIAT, 1982), además de un nicho ecológico protegido de los fenómenos de antagonismo microbiano de la rizosfera (Azcon y Barea, 1980). Por su parte el hongo ayuda en la absorción de nutrientes minerales del suelo, acumulándolos o transfiriéndolos al hospedero (Trappe y Fogel, 1978; Azcon y Barea, 1980).

La mayoría de los micobiontes y hospederos han desarrollado una fuerte interdependencia de su asociación micorrízica, para sobrevivir en ecosistemas naturales (Harley, 1969) .

TIPOS DE ASOCIACIONES MICORRIZICAS Y SU MORFOLOGIA.

Las micorrizas se han clasificado en base a la anatomía de la infección en dos grandes grupos : ectomicorrizas y endomicorrizas

(Lewis, 1973; Trappe y Fogel, 1978). El primer grupo se caracteriza por: 1- un manto de tejido fúngico que rodea a las raicillas del hospedero; 2- la penetración del hongo entre las células corticales de las raicillas, (retículo de Hartig), pero no dentro de la célula (Trappe y Fogel, 1978; Azcon y Barea, 1980). Las ectomicorrizas son características en sistemas radicales de muchas familias de plantas leñosas, incluyendo Betulaceae, Fagaceae, Pinaceae, Tiliaceae y Salicaceae (Meyer, 1973; Trappe y Fogel, 1978). Los micobiontes de este tipo de micorriza están representados en muchos géneros de Basidiomycetes, Ascomycetes y Zygomycetes (Trappe, 1962, 1971; Gerdemann y Trappe, 1974; Trappe y Fogel, 1978).

En el grupo de las endomicorrizas se incluyen diversas categorías de asociación hongo-hospedero (Trappe y Fogel, 1978), entre las cuales tenemos las micorrizas vesículo-arbusculares, las micorrizas tipo orquidácea y las tipo ericácea. Las endomicorrizas se caracterizan porque el hongo no forma manto en la raíz, y las hifas penetran en el interior de las células corticales (Kelley, 1950; Trappe y Fogel, 1978; Azcon y Barea, 1980).

La micorriza tipo orquidácea como su nombre lo indica, se presenta en el orden Orchidales. Los hongos involucrados son miembros del género-forma Rhizoctonia. Los estados perfectos de algunos de estos hongos han sido observados, colocándolos en los géneros Ceratobasidium, Sebacina y Tulasnella (Hadley, 1975; Warcup, 1975). Además de su acción micorrízica, son considerados como saprófitos o patógenos en otras plantas (Furman y Trappe, 1971).

La micorriza tipo ericácea se presenta en la mayoría de los miembros del orden Ericales, aunque algunos géneros (Arbutus, Arctostaphylos) forman además ecto o ectendomicorrizas (Trappe, 1964; Zak, 1974). Los micobiontes de este tipo de endomicorriza, hasta donde se conoce, incluyen algunos Discomycetes (Read, 1974). Hay otros hongos que pueden también formar este tipo de micorriza. En varios estudios ultraestructurales de raíces con micorriza tipo ericácea, se han encontrado hifas de Ascomycetes y Basidiomycetes, algunas veces ambas en la misma célula (Seviour, et al., 1973; Bonfante-Fasolo, 1980; Peterson, et al., 1980).

En las llamadas micorrizas vesículo-arbusculares (V.A.), el micelio intracelular está constituido por ramificaciones del micelio intercelular que eventualmente penetra las células formando internamente estructuras características como vesículas y arbúsculas , (Holley y Peterson,1979; Azcon y Barea,1980). Este tipo de endomicorriza ocurre en la gran mayoría de especies de plantas vascula - res y aparentemente en todos los habitat que estas plantas resistan (Gerdemann,1968). En Pteridophyta, Cupressaceae, Taxodiaceae y la mayoría de los taxas de monocotiledoneas y dicotiledóneas (Trappe y Fogel,1978), incluyendo importantes plantas de cultivo (Nicolson , 1967; Sutton,1973). Corrientemente los hongos que forman micorriza V.A., se incluyen en cuatro géneros de la familia Endogonaceae , (Zygomycetes),llamados Glomus,Sclerocystis,Gigaspora y Acaulospora (Gerdemann y Trappe,1974; Azcon y Barea,1980).

EFECTO BENEFICO DE LA MICORRIZA

Diversos estudios han demostrado que este tipo de asociación simbiótica normalmente provoca un aumento en la supervivencia y crecimiento de la planta hospedera (Gerdemann,1968; Ruehle y Marx, 1979; Maronek et al.,1981), especialmente en suelos de baja a moderada fertilidad (Aldon,1975; Khan,1975; Ruehle y Marx,1979).

Los hongos micorrízicos con sus hifas externas, aumentan la absorción de elementos relativamente inmóviles del suelo, tales como fósforo, cobre, y zinc, por un aumento sustancial en el área de absorción (Menge et al., 1980).

PRODUCCION DE LA INFECCION

La micorriza vesículo-arbuscular se origina a partir de la germinación de esporas o bien a partir de micelio originado en una raíz previamente infectada (Azcon y Barea,1980). Las esporas se pueden formar individualmente en el suelo, o en esporocarpos hipógeos (raramente epígeos) (Rhodes y Gerdemann,1980). Bajo condiciones favorables, la espora germina, el tubo germinativo crece a tra

vés del suelo y puede eventualmente hacer contacto con las raíces de un hospedero adecuado. Aquí se forman apresorios y se lleva a cabo la penetración de la hifa dentro o entre células epidérmicas. La hifa crece a través de la epidermis y dentro de la corteza donde se ramifica tanto intercelular como intracelularmente (Rhodes y Gerdemann, 1980).

FORMACION Y FUNCIONAMIENTO DE VESICULAS Y ARBUSCULAS

Una hifa creciendo dentro de una célula cortical puede sufrir ramificaciones dicotómicas repetidas, siendo las últimas ramificaciones de aproximadamente una micra de diámetro. Estas estructuras altamente ramificadas son llamadas arbúsculas (Gallaud, 1905; Holley y Peterson, 1979; Azcon y Barea, 1980). Como mencionan Cox y Tinker (1976), un resultado de la formación de arbúsculas es un aumento sustancial en el citoplasma de la célula hospedera. También se han reportado aumento en los orgánulos celulares como mitocondrias, ribosomas, retículo endoplasmático y dictiosomas (Cox y Sanders, 1974; Kinden y Brown, 1975). Las vacuolas de esas células, según Kinden y Brown (1976), son más pequeñas y numerosas .Otros autores mencionan que la desaparición de las reservas de almidón está también asociada con la síntesis de citoplasma (Janse, 1896; Gallaud, 1905; Kinden y Brown, 1975) ; además se menciona que el núcleo de las células afectadas llega a aumentar su tamaño (Gallaud, 1905; McLuckie y Burgess, 1932; Mosse, 1963).

Las arbúsculas permanecen intactas solamente por un breve período. Un promedio de 4 días (Cox y Tinker, 1976) o 4-15 días (Bevege y Bowen, 1975) han sido calculados para el proceso que incluye desde la formación de arbúsculas, hasta la completa desintegración de éstas. No se conoce si la desintegración de las arbúsculas es un proceso estrictamente autolítico o si está involucrada la digestión por el hospedante (Rhodes y Gerdemann, 1980). Ese proceso de desintegración de las arbúsculas comienza con el deterioro del citoplasma de la hifa arbuscular, seguida por un colapso de las paredes hifales de las extremidades de las ramas arbusculares individuales (Cox y Sanders, 1974; Kinden y Brown, 1976). Después del dete

rioro de las arbúsculas, el núcleo de la célula hospedante retorna a su tamaño normal y el almidón puede reaparecer (Gallaud, 1905).

Las vesículas (Janse, 1896) son protuberancias hifales, globosas o elípticas, que pueden aparecer tanto intercelular como intracelularmente. Ellas usualmente se forman en el extremo, aunque pueden estar intercaladas en la hifa. Las vesículas contienen gotitas de aceite y usualmente se asume que estos órganos realizan una función de almacenamiento para el endófito (Rhodes y Gerdemann, 1980; Azcon y Barea, 1980). Si las vesículas forman pared gruesa, llegan a parecerse a esporas en morfología y función (Rhodes y Gerdemann, 1980).

CAPTACION DE NUTRIENTES POR LAS MICORRIZAS V.A.

Las observaciones más frecuentemente reportadas, indican que las micorrizas V.A. mejoran el crecimiento de las plantas, debido a un aumento en la captación de nutrientes inorgánicos del suelo (Harley, 1971; Bartlett y Lewis, 1973). Se ha notado que el fósforo (P) es el nutriente más firmemente asociado con la respuesta en crecimiento de las plantas con micorriza V.A. y es el elemento encontrado en mayor concentración en plantas micorrizadas, en comparación con plantas no micorrizadas (Mosse, 1973a; Gerdemann, 1975; Tinker, 1975). Se ha reportado también que las micorrizas pueden aumentar la captación de otros iones tales como zinc (Gilmore, 1971; Bowen et al., 1974; Menge et al., 1980); potasio (Powell, 1975); estroncio (Jackson et al., 1973); cobre (Mosse, 1973a; Menge et al., 1980); azufre (Gray y Gerdemann, 1973; Cooper y Tinker, 1978; Rhodes y Gerdemann, 1978b).

Toma de nutrientes por las hifas externas

Se conoce relativamente poco acerca de la absorción de iones por las hifas externas. El hecho de que los hongos micorrízicos V.A. son simbiontes obligados ha dificultado los estudios de captación de nutrientes en cultivos fungales asépticos. Se asume que el transporte activo de iones a través de la plasmalema fungal ocu -

ren en las hifas externas (Rhodes y Gerdemann, 1980). Estas hifas se extienden por el suelo, formando un retículo flojo que puede crecer hasta una distancia considerable, distribuido estratégicamente en las capas superficiales del suelo (Rhodes y Gerdemann, 1980). El micelio externo así, desempeña un papel importante en la transferencia de nutrientes minerales hacia la planta (Azcon y Barea, 1980). La extensión del micelio externo usualmente no es evidente, ya que éste se quiebra fácilmente cuando las raíces son removidas del suelo. Sin embargo, dejando que las micorrizas se desarrollen en cámaras especiales para la observación de las raíces, se pueden observar fácilmente las hifas externas (Rhodes y Gerdemann, 1980). Rhodes y Gerdemann (1975) observaron que en raíces de cebolla inoculadas con Glomus fasciculatus, las hifas externas habían crecido ocho centímetros, a las seis semanas de la inoculación.

Transferencia de iones a las estructuras fúngicas internas.

Una vez absorbidos por las hifas externas, los nutrientes iónicos son trasladados a las estructuras fungales internas en las raíces (Rhodes y Gerdemann, 1980). La velocidad a la cual este proceso ocurre, en relación a la velocidad a la cual los iones pueden moverse a través del suelo por flujo de masas o por difusión, es uno de los factores determinantes de la importancia de las micorrizas para ese nutriente particular (Rhodes y Gerdemann, 1980). Por ejemplo, el fósforo se encuentra en concentraciones extremadamente bajas en soluciones de suelo, usualmente 1 ppm (Reisenaver, 1966), además de que es fácilmente absorbido por coloides del suelo. El movimiento del fósforo hacia las raíces de las plantas por flujo de masas o por difusión en el suelo, es pues, muy leve (Rhodes y Gerdemann, 1980).

Sanders y Tinker (1971) midieron la acumulación de fósforo a intervalos regulares en tejidos de plantas de cebolla micorrizadas y no micorrizadas y determinaron que la proporción de entrada de fósforo a las plantas micorrizadas no puede ser explicada por flujo de masas o por difusión de P a través del suelo. Ellos concluyeron que la rápida proporción de movimiento de fósforo a las raíces pue

de solamente ser explicada asumiendo la existencia de transferencia de P a través de las hifas.

La habilidad de los hongos micorrízicos para trasladar P fue demostrada por Hattingh y colaboradores (1973); los hongos micorrízicos Endogone mosseae (=Glomus mosseae) y E.fasciculatus (=Glomus fasciculatus) formaron micorriza en cebollas, y las hifas crecieron desde raíces confinadas en suelo adyacente. Cuando se inyectó P^{32} en el suelo, en el cual las hifas externas estaban presentes , este elemento fue detectado en las raíces del hospedante, dos días después. Cuando el P^{32} se inyectó en el suelo en el cual estaban creciendo plantas no micorrizadas, este elemento no fue detectado en las raíces. Además,cuando las hifas externas fueron separadas de las raíces antes de inyectar el P^{32}, no se detectó transporte de ese elemento. En otros experimentos Rhodes y Gerdemann (1975) mostraron que el transporte de P por las hifas puede ocurrir desde 7 centímetros de la superficie de la raíz. Las plantas no micorrizadas no obtuvieron P^{32} aún cuando fueron inyectadas a 1 cm de la superficie radical. Así demostraron que las raíces micorrizadas tienen acceso a un volumen mucho mayor de suelo del cual ellas pueden obtener fósforo.

Hay mucha evidencia de que el fósforo es transferido en forma de polifosfato. Cox, et al.(1975) y Ling-Lee y colaboradores(1975) observaron unos cuerpos en las hifas de hongos V.A. que mostraron una reacción característica de polifosfato,cuando se tiñeron con toluidina azul; en base a esta evidencia y otras pruebas histoquímicas, ellos sugirieron que estos cuerpos eran gránulos de polifosfato. Cox y colaboradores (1975) encontraron gránulos de polifosfato en las vacuolas fungales. Se ha observado que las vacuolas se mueven rápidamente con el flujo citoplasmático en el lumen fúngico consecuentemente se ha sugerido que el polifosfato puede servir como un medio eficiente de transferencia de fósforo por las hifas externas(Cox,et al.,1975; Tinker,1975).

Transferencia de fósforo desde el hongo al hospedero

Generalmente se asume que los principales sitios de liberación de nutrientes al hospedero son las arbúsculas (Rhodes y Gerdemann, 1980). Estos autores citan dos razones para esta suposición: 1- se cree que las ramas arbusculares aumentan grandemente el área de superficie de contacto entre el hospedero y el hongo, proporcionando una mayor área de superficie para el intercambio de nutrientes, y 2- se ha observado que las arbúsculas se descomponen dentro de la célula hospedera, indicando ya sea la digestión de la arbúscula por el hospedante, o la autolísis ; cualquiera de los dos procesos resulta en una liberación del contenido hifal a la célula hospedera. También se ha sugerido que parte de esta transferencia de nutrientes al hospedero puede llevarse a cabo a través de las membranas fúngicas y del hospedero (Cox y Tinker, 1976; Azcon y Barea, 1980 Rhodes y Gerdemann, 1980). Diversas técnicas usando radioisótopos , han arrojado alguna luz sobre el rol de las arbúsculas y otras estructuras fúngicas internas en la liberación de nutrientes del hongo al hospedero. Después de la aplicación de una solución conteniendo P^{32}, a medios con cultivo de cebolla, Gray y Gerdemann (1969), encontraron una mayor emisión en segmentos de raíces micorrizadas en comparación con segmentos no infectados. Usando microanálisis con rayos X, Schoknecht y Hattingh (1976) encontraron que el citoplasma de las células que contenían arbúsculas, tenían mayores concentraciones de fósforo que las células corticales adyacentes carentes de arbúsculas. También las ramas arbusculares tenían mayores concentraciones de P que el citoplasma hospedero que las rodeaba.

RELACION MICORRIZA AGUA

Algunos experimentos indican que, para una especie hospedera dada, las plántulas micorrizadas resisten la sequía mejor que las no micorrizadas (Bowen, 1973). Safir et al. (1971-1972), proponen que la mejoría en el transporte de agua en frijol de soya micorrizado, puede ser atribuido a una mejor nutrición con fósforo. Ellos men-

cionan que la infección micorrízica V.A. aumentó el transporte de agua desde el suelo, a través de las raíces, hasta las hojas de la planta hospedera.

DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD DEL MICOBIONTE

Los hongos que forman micorrizas V.A., tienen un espectro de hospederos extremadamente amplio, lo que obliga a catalogarlos como inespecíficos (Azcon y Barea, 1980). Sin embargo se registran diferencias en el grado de susceptibilidad del hospedero y en la adaptabilidad del hongo a determinadas condiciones. La existencia por ejemplo, de hongos más adaptados a micorrizar especies forestales y, otros, a cultivos agrícolas, es un hecho comprobado (Azcon y Barea, 1980).

FACTORES QUE AFECTAN LA MICORRIZACION

Diversos estudios han demostrado la existencia de diferencias específicas entre varias especies de micobiontes y aún entre cepas dentro de una especie. Varios estudios informan en torno a las respuestas a la temperatura y humedad (Mexal y Reid, 1973); solubilización y toma de fósforo (Mejstřik, 1970; Bowen, 1973); utilización de nitrógeno (Bowen, 1973); producción de enzimas, metabolitos y antibióticos (Slankis, 1973; Marx, 1973) y la resistencia de las hifas a la descomposición por otros organismos. Esto nos indica que son varios los factores que pueden afectar el desarrollo y la actividad de las micorrizas V.A.

La luz es un factor importante en la infección V.A. (Hayman, 1974). En plantas sometidas a mucha sombra, la infección se reduce drásticamente y la producción de esporas baja en un 80% (Azcon y Barea, 1980).

La temperatura es otro factor que influye sobre este tipo de asociación (Furlan y Fortin, 1973; Hayman, 1974). Schenck y Schroder (1974) en estudios sobre la respuesta a la temperatura, de la micorriza formada por una especie de Endogone, en las raíces de

frijol de soya, observaron que el máximo desarrollo arbuscular ocurrió cerca de los 30°C. El desarrollo de micelio de Endogone sobre la superficie de la raíz fue mayor entre 28 y 34°C. Otros estudios muestran que esporas de especies de Gigaspora, están adaptadas a altas temperaturas, obteniéndose un máximo de germinación de esporas a 34°C (Schenck, et al., 1975). Estos mismos investigadores observaron que otras especies pueden adaptarse a temperaturas más bajas, como por ejemplo, Glomus mosseae, cuya máxima germinación de esporas ocurrió a los 20°C. Por otra parte Daniels y Trappe (1980), encontraron que la máxima germinación de esporas de Glomus epigaeus ocurrió entre 18-25°C .

El pH del suelo es otro de los factores que pueden afectar la micorrización (Mosse, 1972; Green et al., 1976). Un pH óptimo para que se de la micorrización en forma natural es de 5.55 a 6.8 (Azcon y Barea, 1980) .

Se ha demostrado que la alta humedad del suelo trae como resultado una baja colonización (Mejstřik, 1965; Redhead, 1971; Khan, 1972; Trinick, 1977). Sin embargo aún se conoce poco acerca de la influencia de diferentes potenciales de humedad en la germinación y colonización por hongos micorrízicos V.A. (Trinick, 1977). Daniels y Trappe (1980) encontraron que la máxima germinación de esporas de Glomus epigaeus ocurrió a niveles iguales o sobre la capacidad de campo.

Se ha reportado también que condiciones de alta fertilidad en el suelo, generalmente reducen la infección (Gerdemann, 1968; Mejstřik, 1973; Mosse, 1973a; Hepper et al, 1976; Azcon y Barea, 1980). Varios investigadores han demostrado que altos niveles de fósforo reducen el número de esporas en el campo (Hayman, 1970; Khan, 1972 ; Kruckelmann, 1975; Ross et al., 1977) ; además de reducir la infección micorrízica (Daft y Nicolson, 1969, 1972; Mosse y Phillips, 1971; Mosse, 1973b; Sanders, 1975). Consecuentemente a niveles muy altos de fósforo, solo una pequeña fracción del sistema radical puede ser infectado. Algunos experimentos han demostrado que es la concentración de fósforo en el tejido de la planta, más que el fósforo en el suelo, lo que regula el grado de infección micorrízica .

Sanders (1975), encontró que la aplicación foliar de fósforo a plantas de cebolla, resultó en una disminución de la infección micorrízica. Un resultado similar lo obtuvieron Menge y colaboradores(1978) quienes usaron una técnica consistente en separar en porciones el sistema radical. Ellos encontraron que cuando una mitad del sistema radical de Sorghum sudanense creció en un suelo con alto contenido de fósforo, la infección micorrízica se redujo en la otra mitad del sistema radical, aún cuando esta parte creció en un recipiente separado, en suelo relativamente bajo en fósforo. El mecanismo bioquímico por el cual el fósforo actua inhibiendo la infección micorrízica, es aún desconocido. Estudios recientes, indican la presencia de una fosfatasa alcalina micorriza-específica (MSAP) la cual tiene una actividad óptima que coincide estrechamente con el período más activo de la infección micorrízica (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi,1976;1978). Se ha sugerido que esta MSAP puede estar involucrada en el establecimiento de la infección micorrízica. Además la MSAP es reprimida en presencia de fósforo, indicando un posible mecanismo por el cual la infección micorrízica puede ser suprimida por un aumento en la concentración de fósforo en los tejidos radicales (Rhodes y Gerdemann,1980). Muy poca atención ha sido dada al efecto del fósforo sobre el desarrollo del micelio externo, aunque existe una estrecha correlación entre el micelio externo y el desarrollo del hongo en la corteza radical (Nicolson,1967; Sanders y Tinker,1973; Sanders,et al.,1977). Así , niveles de fósforo que reducen el micelio interno probablemente también causan una reducción correspondiente del micelio externo ; por tanto, como las hifas externas funcionan también en la transferencia de otros nutrientes, además del fósforo, la reducción de la infección causada por la fertilización con fósforo podría ser de importancia en la reducción de la captación de esos iones esenciales. Por ejemplo, se ha reportado que ciertas deficiencias de micronutrientes, particularmente de zinc y cobre, resultan de la alta fertilización con fósforo (Olsen,1972; Timmer y Leyden,1978 ; Gilmore,1971; LaRue y colaboradores,1975).

Para probar la hipótesis de que la nutrición con fósforo podría

influir la captación de micronutrientes por afectar los niveles de infección, Rhodes y Gerdemann (1978a), hicieron crecer cebollas micorrizadas y no micorrizadas, en cámaras especiales, a dos niveles de fósforo. Las cebollas inoculadas que crecieron en el suelo con un nivel de fósforo moderado (45 ug P/g suelo), tuvieron una infección micorrízica mayor de 70% y fueron capaces de obtener P^{32} o Zn^{65} inyectados a 4.5 cm de la raíz. Las cebollas control, no micorrizadas, no tuvieron acceso a los trazadores inyectados, indicando que la transferencia hifal estaba supliendo los nutrientes a las raíces micorrizadas. Las plantas inoculadas que crecían en suelos altos en fósforo (97 ug P/g suelo) tuvieron menos de 8% de infección y no fueron capaces de obtener P^{32} y Zn^{65}.

MICORRIZAS Y ORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO

No se conoce que los micobiontes fijen nitrógeno, sin embargo, en algunos casos los organismos fijadores de nitrógeno son componentes de la rizosfera y posiblemente son estimulados por ella (Rambelli, 1973). Las micorrizas están involucradas en la nutrición de nitrógeno en las leguminosas, a través de una interacción con nódulos en las raíces, formados por especies de Rhizobium (Rhodes y Gerdemann, 1980). En suelos deficientes en fósforo, las micorrizas son potencialmente importantes para el adecuado funcionamiento de la fijación simbiótica de nitrógeno por Rhizobium. Esto ha sido demostrado en suelos esterilizados (Mosse, at al., 1976; Smith y Daft, 1977) y en suelos no esterilizados (Mosse, 1977). Diversas investigaciones de la triple asociación Rhizobium-hongo micorrízico-leguminosas, en frijol de soya (Ross y Harper, 1970; Carling, et al, 1978); maní y alfalfa (Daft y El Giahmi, 1974-1975-1976; Smith y Daft, 1977) trébol (Crush, 1974; Mosse et al., 1976); han mostrado que la nodulación es mejor y que la fijación de nitrógeno, peso seco y el contenido de fósforo son mayores cuando las plantas están infectadas por hongos micorrízicos V.A.

ASOCIACION DE LEGUMINOSAS CON ORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO

Las leguminosas son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico a través de una asociación simbiótica con bacterias del suelo pertenecientes especialmente al género Rhizobium. Estos organismos penetran en las leguminosas por los pelos radicales y provocan la formación de nódulos (Alexander, 1977). La bacteria obtiene alimento de la planta y le proporciona a ésta, a su vez, nitrógeno asimilable.

El área inmediatamente adyacente al sistema radical de las leguminosas es el sitio de origen de la infección de Rhizobium, no es sorprendente que la microflora asociada tenga influencia en el desarrollo de la simbiosis (Nutman, 1970).

La supervivencia, el establecimiento y persistencia de Rhizobium en su estado saprofítico, como en la rizosfera, así como los procesos de infección, nodulación y/o fijación de nitrógeno, están marcadamente afectados, directa o indirectamente por varios factores. Por ejemplo, la segregación por parte de algunos microorganismos , de sustancias con principios antibióticos que afectan el desarrollo de Rhizobium (Alexander, 1977; Brockwell, 1974); la segregación por parte del mismo Rhizobium de sustancias bacteriostáticas involucradas en un mecanismo autorregulador del tamaño poblacional de la bacteria (Vidor, sf); la segregación de compuestos radiculares por parte de la leguminosas, las cuales pueden presentar un efecto estimulante o inhibitorio en el establecimiento de la infección bacterial en los pelos radicales (Dazzo, 1980); la competencia de Rhizobium con otros organismos por espacio y nutrientes que se verifica durante la colonización de la rizosfera (Brockwell, 1974; Vidor, sf).

Otros factores que afectan el establecimiento de la simbiosis de Rhizobium , son la temperatura y el pH del suelo. Se considera que la mejor temperatura para el crecimiento de Rhizobium está entre 25-30°C con un óptimo de 28°C (Ballati, sf; Stowers y Elkan, 1980). Graham, (1977) estableció un promedio de temperatura óptima para la nodulación de 30°C, con una alta disminución en la fijación entre

los 30-35°C (Graham y Halliday, 1977). En cuanto al pH, Alexander (1977) y Munns (1978) han informado que la infección y la formación de nódulos difieren en su tolerancia a la acidez. Otros autores opinan que la inoculación y la sobrevivencia de Rhizobium se favorecen con un pH de 6.8 ; un pH menor de 5.2 o mayor de 8.5 limitan estas propiedades (Graham, 1977; Stowers y Elkan, 1980).

Algunos investigadores han encontrado que la adición de nitrógeno combinado, reduce la nodulación y la fijación de nitrógeno por parte de Rhizobium (Cartwright, 1967; Ruschel y Ruschel, 1975; Chávez, et al., 1977). Sin embargo Ruschel y Reuszen (1973) observaron un comportamiento relativamente diferente entre las cepas de la bacteria Rhizobium y la nodulación, en presencia o ausencia de nitrógeno.

Diversos estudios realizados permiten comprobar que existe una gran competencia por los sitios activos de la raíz por parte de las cepas nativas e inoculadas de Rhizobium (Weaver y Frederick, 1974; Frederick, 1978; Brockwell, 1981). Algunos investigadores han coincidido en que el Rhizobium nativo presenta una alta capacidad competitiva y a su vez una baja capacidad fijadora de nitrógeno (Erdman, 1948; Weaver y Frederick, 1974; Obaton, 1977; Stowers y Elkan, 1980).

MATERIALES Y METODOS

Esta investigación se realizó en un invernadero de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, sita en San Pedro de Montes de Oca, a 1235 msnm.

Preparacion del suelo

El suelo que se utilizó como sustrato se colectó en un potrero localizado en San Antonio de Belén. Se analizó físicamente en el laboratorio de suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica, y el análisis químico se realizó en el laboratorio de suelos del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Los datos de estos análisis se presentan en el cuadro 1 del apéndice.

El suelo se esterilizó primero en autoclave a 125 °C por una hora. Posteriormente se colocó el suelo formando una especie de pirámide, en un extremo de la cama de cemento del invernadero; se colocó una lata de bromuro de metilo en el centro y se tapó la tierra con un plástico, sellando bien los bordes para evitar el escape del gas. Luego, con una varilla con un clavo en el extremo, se abrió la lata y se dejó durante 24 horas, después de lo cual se dejó airear por cuatro días. Una vez esterilizado el suelo, se colocó en bolsas plásticas negras 20 X 38 cm, previamente esterilizadas con alcohol 95. En cada bolsa se colocaron aproximadamente 3150 gramos de suelo.

Preparación de las semillas

Se utilizaron semillas de *Cajanus cajan* variedad 67-28, traidas de la Estación Experimental Fabio Baudrit. Estas se seleccionaron en cuanto a forma y tamaño. Se esterilizaron de la siguiente manera

-se lavaron con alcohol de 95 por 3 min., luego con agua destilada estéril; se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 3 min. y se lavaron 3-5 veces con agua destilada estéril. Se dejaron en imbibición por 24 horas y se pusieron a pregerminar dos días en placas de petri estériles con medio agar-agua al 1% previamente esterilizado, hasta que las raicillas midieron aproximadamente 1 cm.

Preparación de los inóculos

Como inóculo de micorriza se usaron esporas del hongo micorrizante extraídas del suelo circundante a las raicillas de Emilia fosberii Nicolson. planta que según estudios previos por el método de tinción de raicillas descrito por Phillips y Hayman (1970),se determinó que presentaban suficiente micorrización. Estas esporas se obtuvieron con base en el método de decantado o filtrado del suelo (Gerdemann y Nicolson,1963),para lo cual se mezclaron 250 cc de suelo en 1000cc de agua, se pasó por una gasa para separar partículas grandes; el filtrado se dejó reposar por 15-30 min. y se pasó por un tamis fino para retener las esporas,las cuales se transfirieron a papel de filtro en placas de petri. Algunas de estas esporas se estudiaron al microscopio de luz y de acuerdo a las características que presentaban,se definió que pertenecían a la especie Glomus tortuosum Schenck y Smith (Schenck y Smith,1982). Las esporas se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 0.1% por aproximadamente 3 min. y se lavaron con agua destilada estéril. También se utilizó como inóculo de micorriza, las raicillas micorrizadas de la misma planta, esterilizadas con peróxido de hidrógeno al 0.5% por 3 min. y lavadas con agua.

Como inóculo de la bacteria se utilizó Rhizobium phaseoli var mexico, la cual fue proporcionada por el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA).

Preparación de los tratamientos.

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

GSE: Plantas de gandul en suelo sin esterilizar, sin inocular

G : Plantas de gandul en suelo estéril, sin inocular (testigo)

GA : Plantas de gandul en suelo estéril, abonadas.

GR : Plantas de gandul en suelo estéril, inoculadas con Rhizobium

GM : Plantas de gandul en suelo estéril, inoculadas con hongo micorrizante.

GRM : Plantas de gandul en suelo estéril, inoculadas con Rhizobium y con hongo micorrizante.

Se prepararon trece bolsas por tratamiento, en cada bolsa se colocó una semilla pregerminada.

Para preparar el tratamiento GM, se colocó un disco de papel de filtro, esterilizado con rayos ultravioleta, a 2 cm de profundidad, sobre él se colocó un gramo de trocitos de raicillas micorrizadas y aproximadamente diez esporas del hongo micorrizante; esto se tapó con 1 cm. de suelo, se colocó la semilla y se cubrió con el suelo restante.

Para el tratamiento GRM, se procedió de la misma forma,pero a la hora de colocar la semilla, se inoculó con 1 cc de una solución salina al 0.85% en la cual se encontraba la bacteria en suspensión, y se cubrió con el resto del sustrato.

Para el tratamiento GR, se colocó la semilla a 1 cm de profundidad, se inoculó 1 cc de la suspensión de bacteria, y se tapó con el suelo.

Para los tratamientos GSE, G, y GA, las semillas se colocaron a 1 cm de profundidad y se cubrieron con suelo. En el caso GA, seis días después de la siembra, cuando ya las plántulas estaban bien establecidas, se aplicó el abono químico , para lo cual se utilizó , para cada planta, 0.125 gramos de sulfato de potasio (K_2SO_4), y , 0.3566 gramos de fosfato ácido de amonio $(NH_4)_2$ H PO_4 en solución . Con estos compuestos se adicionó al suelo los elementos más importantes como son Nitrógeno, Fósforo y Potasio, en cantidades adecuadas .

Las plantas se mantuvieron con riego adecuado y además se mantuvo un control de la temperatura del suelo, la cual osciló entre 20-28°C.

Parámetros evaluados

El trabajo experimental en el invernadero duró doce semanas, eva

luándose semanalmente el tamaño de las plantas en cada tratamiento. A las doce semanas se escogieron las ocho plantas más homogeneas de cada tratamiento y se evaluaron los siguientes parámetros:

1- Presencia o ausencia de micorrización
2- Altura de la planta
3- Area foliar
4- Peso seco de la parte aérea
5- Peso seco del sistema radical
6- Número de nódulos
7- Peso seco de los nódulos
8- Nitrógeno y fósforo total/planta

Para evaluar el peso seco, se colocaron las muestras en una estufa a 65°C por aproximadamente 48 horas, hasta obtener un peso constante.

Los análisis foliares se realizaron con la colaboración del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA). Para el caso del análisis de nitrógeno, se utilizó el método de Kjeldhal (Briceño, et al., 1984). En el caso del fósforo , el método utilizado fue el colorimétrico , también descrito por Briceño et al.(1984).

La determinación de la presencia o ausencia de micorrización en las raicillas se determinó clarificándolas en KOH y luego tiñendolas con tripano azul (Phillips y Haymann, 1970).

Análisis estadístico

Los parámetros evaluados fueron analizados por el análisis de variancia (Daniel, 1980). Para comparar las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de Duncan (Reyes, 1980). Las diferencias significativas fueron asociadas con un mínimo de probabilidad a un nivel de 0.01 o 0.05 según el caso.

RESULTADOS

En las páginas 18 y 19, sección de materiales y métodos, se presentan los diferentes tratamientos evaluados en esta investigación, y las iniciales con las cuales se identificó a cada uno de ellos . En esta sección se utilizarán las mismas iniciales para cada uno de ellos, especialmente en la confección de los cuadros y las figuras.

- A las siete semanas de haberse montado el experimento, se tomaron algunas fotografías, escogiendo una planta de cada tratamiento para hacer comparaciones entre ellas, especialmente en cuanto al desarrollo alcanzado hasta ese momento. En la figura 1 , se puede observar que a las siete semanas ya era muy evidente la diferencia en desarrollo entre las plantas abonadas , en comparación con las plantas de otros tratamientos como G y GSE .

En la figura 2 se comparan las plantas que tenían algún tipo de inóculo, con las que crecían en suelo sin esterilizar. Se puede observar aquí que la planta un poco más alta era la que crecía en suelo sin esterilizar (GSE), la cual medía 29,6 cm; ésta es seguida en tamaño por la planta inoculada con micorriza (GM) que medía 27,4 cm, las plantas con menor tamaño eran la inoculada con Rhizobium y micorriza (GRM) con 24 cm y la inoculada solo con Rhizobium (GR) , que medía 23,8 cm.

En la figura 3 se muestran las raíces de una planta inoculada solo con Rhizobium (GR) y una inoculada con Rhizobium y micorriza , (GRM). En estos sistemas radicales se puede observar la presencia de gran cantidad de nódulos distribuidos principalmente en la parte superior del sistema radical.

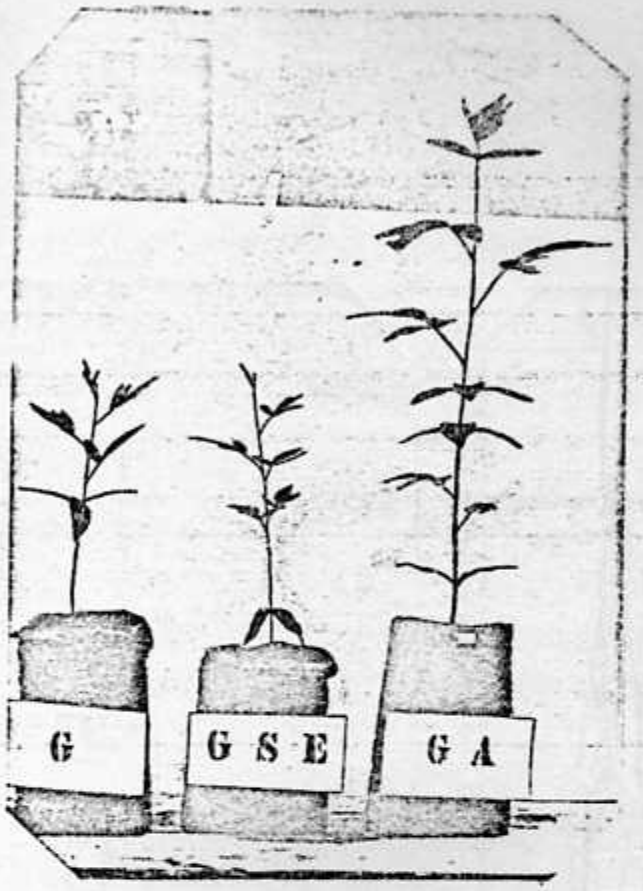


FIGURA 1 : Comparación de la altura en tres de los tratamientos (G, GSE, GA), a las siete semanas.

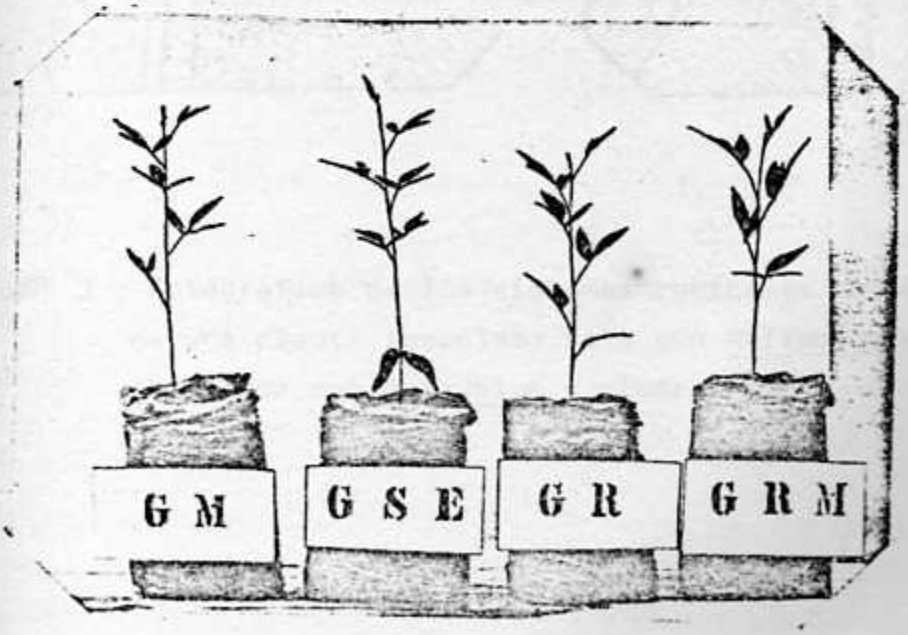


FIGURA 2 : Comparación de la altura de cuatro tratamientos, (GM,GSE,GR,GRM), a las siete semanas.

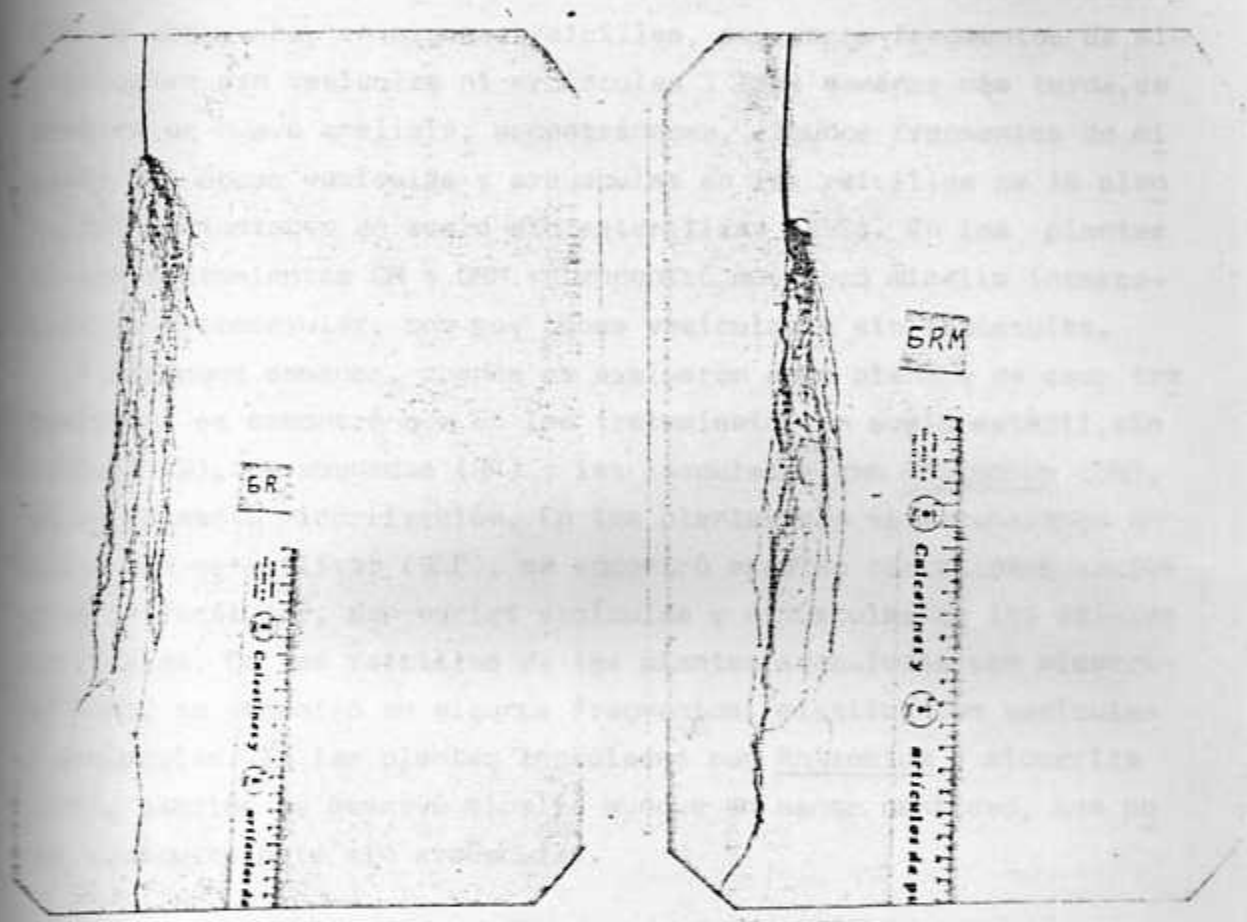


FIGURA 3 : Fotografías de los sistemas radicales nodulados de una planta inoculada solo con Rhizobium y otra inoculada con Rhizobium y micorriza.

- La primera determinación de presencia o ausencia de micorrización se hizo a las cuatro semanas. Se tomaron raicillas de una de las plantas de cada tratamiento; se aclararon y tiñeron; se observaron al microscopio y se encontró que solamente en los tratamientos GM y GRM se observaba, en algunas raicillas, muy pocos fragmentos de micelio,pero sin vesículas ni arbúsculas . Tres semanas más tarde,se realizó un nuevo análisis, encontrándose, algunos fragmentos de micelio con pocas vesículas y arbúsculas en las raicillas de la planta del tratamiento en suelo sin esterilizar (GSE). En las plantas de los tratamientos GM y GRM se encontró muy poco micelio intercelular e intracelular, con muy pocas vesículas y sin arbúsculas.

A las doce semanas, cuando se evaluaron ocho plantas de cada tratamiento, se encontró que en los tratamientos en suelo estéril,sin inóculo (G),las abonadas (GA) y las inoculadas con Rhizobium (GR), no se presentó micorrización. En las plantas que se encontraban en suelo sin esterilizar (GSE), se encontró micelio tanto intercelular como intracelular, con varias vesículas y arbúsculas en las células corticales. En las raicillas de las plantas inoculadas con micorriza (GM), se encontró en algunos fragmentos, micelio, con vesículas y arbúsculas. En las plantas inoculadas con Rhizobium y micorriza (GRM), también se observó micelio aunque en menor cantidad, con pocas vesículas,pero sin arbúsculas.

- En cuanto a la observación directa de la apariencia de las plantas, se notó que a las ocho semanas era evidente la diferencia de coloración del follaje, especialmente entre las plantas que habían sido abonadas, las cuales presentaban hojas grandes, de color verde oscuro, en comparación con las hojas en los tratamientos restantes,que eran mucho más pequeñas, con coloración verde muy claro.

A las nueve semanas se notó que las plantas de los tratamientos en suelo estéril sin inóculo (G), y las inoculadas con Rhizobium y micorriza (GRM), empezaban a perder las hojas trifoliadas. Posteriormente siguieron los tratamientos GM,GR y GSE. En las plantas de estos tratamientos el follaje presentaba además cierto grado de decoloración, siendo esta característica más evidente en las plantas

testigo (G). Las plantas que se encontraban en suelo sin esterilizar (GSE), presentaban una coloración un poco más oscura.

A las doce semanas se observó que las plantas abonadas eran las más vigorosas, de tallos más gruesos, hojas grandes y de color verde oscuro. Las plantas que crecieron en suelo sin esterilizar, presentaban en su mayoría follaje con poca clorosis, y habían perdido menor cantidad de hojas que las de los tratamientos GRM,GM,GR y G. Las plantas en suelo estéril e inoculadas con Rhizobium.presentaban bastante clorosis y mucha defoliación, al igual que las micorrizadas (GM) y las inoculadas con Rhizobium y micorriza (GRM). Las plantas que se vieron más afectadas por la clorosis y la defoliación , fueron las que se encontraban en suelo estéril y sin inóculo (G).

- En el cuadro 2 del apéndice, se presentan los datos de la altura promedio evaluada semanalmente en las plantas de cada tratamiento. Estos valores se presentan gráficamente en la figura 4 del apéndice, en la cual se puede observar que, a las cuatro semanas, o sea veintidos días después de haber aplicado el abono , se empezó a notar una diferencia de tamaño de estas plantas, con relación a las plantas de los otros tratamientos, diferencia que se fue haciendo mucho más evidente conforme pasaron las semanas. También se puede observar en esta figura, que la aplicación de la solución salina con la bacteria, afectó en cierto grado el crecimiento de las plantas,siendo las del tratamiento GRM las que se vieron más afectadas.

En el cuadro 3 del apéndice, se presentan los datos de la altura de las plantas al final del experimento.

Es importante hacer notar que en ésta, al igual que en la mayoría de las variables evaluadas en este experimento,debido a que las plantas abonadas presentaban valores muchísimo mayores a los de los restantes tratamientos, se optó por hacer dos análisis de variancia (ANDEVA), uno de ellos incluyendo GA, y el otro excluyéndolo, para poder comparar mejor las medias de los demás tratamientos.

El ANDEVA para los datos de altura de las plantas dió significativo al 1% en los dos casos, como puede comprobarse en el cuadro 4 del apéndice. En cuanto a comparación de medias, el tratamiento GA presentó una diferencia altamente significativa al 1% con respecto

a los tratamientos restantes. Al aplicar la prueba de Duncan excluyendo GA (cuadro 5 del apéndice), se obtuvo una diferencia significativa al 1% entre el valor del tratamiento GSE, con respecto a las plantas en suelo estéril con los dos tipos de inóculo (GRM), siendo estas últimas las que alcanzaron menor altura. En este mismo cuadro se observa que hay diferencia significativa al 5% entre GSE con respecto a los tratamientos GM, GR y G.

- En el cuadro 6 del apéndice se presentan los valores de área foliar obtenidos en cada tratamiento. El análisis de variancia para estos datos dió significativo al 1%, tanto incluyendo GA como excluyéndolo (cuadro 7 del apéndice). La figura 5 del apéndice nos muestra que el área foliar fue mucho mayor en las plantas abonadas en comparación con las plantas de los otros tratamientos, mostrando una diferencia altamente significativa al 1%. En el cuadro 8 del apéndice se muestra que hay diferencia significativa al 5% entre las plantas inoculadas con Rhizobium y micorriza (GRM), con relación a las plantas en suelo sin esterilizar (GSE) y a las inoculadas solo con Rhizobium (GR). En el mismo cuadro se nota que hay diferencia significativa al 1% entre GRM con respecto a las plantas inoculadas solo con micorriza (GM) y a las plantas no inoculadas (G), siendo estos dos últimos, los tratamientos en los que se presentaron los valores de área foliar más bajos

- En el cuadro 9 del apéndice se muestran los datos de peso seco de la parte aérea de las plantas. El análisis de variancia para estos datos, tanto incluyendo como excluyendo GA, dió significativo al 1%,como puede verse en el cuadro 10 del apéndice. En la figura 6 del apéndice se muestra que las plantas abonadas (GA), presentan un valor de peso seco de la parte aérea mucho mayor a los obtenidos en los restantes tratamientos, siendo esta diferencia altamente significativa al 1%. En el cuadro 11 del apéndice se observa que los demás tratamientos alcanzaron valores de peso seco que varían desde 0.48g en las plantas que crecieron en suelo sin esterilizar (GSE) , hasta 0,286g en las plantas que se desarrollaron en suelo estéril, sin inóculo (G). El mismo cuadro nos muestra que se presentó dife -

rencia significativa al 1% entre GSE con respecto a los tratamientos GM, GR, GRM, y G.

- El cuadro 12 del apéndice muestra los datos de peso seco del sistema radical en cada uno de los tratamientos. El ANDEVA para estos datos (cuadro 13 del apéndice), dió significativo al 1% tanto incluyendo GA como excluyéndolo. Como puede observarse en la figura 7 del apéndice, las plantas abonadas (GA) presentaron valores muy superiores a los de las plantas de los otros tratamientos, mostrando diferencia altamente significativa al 1%. La prueba de Duncan, presentada en el cuadro 14 del apéndice dió diferencia significativa , al 1% entre los tratamientos GSE, GR y GM, con respecto al tratamiento testigo (G). Se dió además diferencia significativa al 5% entre GRM y el tratamiento (G).

- En cuanto al número de nódulos, en el cuadro 15 del apéndice se presentan los valores obtenidos en cada tratamiento. Para esta variable, al igual que para el peso seco de los nódulos, se hizo solamente el análisis de variancia incluyendo GA, pues la diferencia entre éste y los restantes tratamientos no era extremadamente grande, como sí ocurrió para las demás variables evaluadas.

El ANDEVA para número de nódulos dió significativo al 1% como puede observarse en el cuadro 16 del apéndice. La figura 8 del apéndice nos muestra que el mayor valor en el número de nódulos se presentó en las plantas abonadas. Observación directa mostró que estos nódulos eran en su mayoría relativamente grandes, corrugados y presentaban una coloración rosada oscuro en su interior. El tratamiento que siguió en cuanto a número de nódulos, fue el de las plantas que se encontraban en suelo sin esterilizar, en las cuales los nódulos eran en su mayoría, de mediano tamaño, generalmente grisáceos en su interior. A este tratamiento le siguió el de las plantas inoculadas con Rhizobium (GR), en las cuales los nódulos eran en su mayoría medianos,corrugados y rosados en su interior; el mismo tipo de nódulos se encontró en las raíces de las plantas inoculadas con Rhizobium y micorriza (GRM). Los tratamientos en los cuales se encontró menor número de nódulos fueron el testigo (G) y el de las plantas inocula

das con micorriza (GM). Los nódulos encontrados en estos tratamien - tos eran muy pequeños y grisáceos en su interior.

El cuadro 17 del apéndice nos muestra que existe diferencia significativa al 1% entre el tratamiento abonado y los tratamientos G , GM y GRM. Además se presentó diferencia significativa al 5% entre GA y GR. En el mismo cuadro se observa que GSE mostró diferencia significativa al 1% con respecto a G y GM y diferencia significativa al 5% con GRM. Se presentó además diferencia significativa al 1% entre GR y los tratamientos G y GM, y diferencia significativa al 5% entre GRM y GM.

- En el cuadro 18 del apéndice se presentan los datos de peso seco en miligramos, de los nódulos. El análisis de variancia para estos datos, como puede verse en el cuadro 19 del apéndice, dió significativo al 1%. En la figura 9 del apéndice, se muestra que los tratamientos GA y GSE, son los que presentan los mayores valores de peso seco de los nódulos, con una diferencia altamente significativa al 1% con relación a los otros tratamientos (cuadro 20 del apéndice). A éstos les siguió el tratamiento GR, el cual presentó diferencia significativa al 5% con respecto al tratamiento GM, y diferencia significativa al 1% con el tratamiento en suelo estéril y sin inóculo, (G). En el caso GRM, se dió diferencia significativa al 5% con respecto al tratamiento G.

- Los datos obtenidos para la variable nitrógeno total (miligramos por planta), se presentan en el cuadro 21 del apéndice.

El análisis de variancia para estos datos, como se puede observar en el cuadro 22 del apéndice, dió significativo al 1% cuando se incluyó GA, y significativo al 5% cuando se excluyó este tratamiento. En la figura 10 del apéndice se muestra que el mayor valor para esta variable fue alcanzado por las plantas abonadas , presentando diferencia significativa al 1% en relación a los demas tratamientos. En el cuadro 23 del apéndice se observa que se presentó diferencia significativa al 1% entre GR y GSE, y diferencia significativa al 5% entre GM y GRM con respecto a GSE, siendo este último tratamiento el que presentó los valores más bajos de nitrógeno total.

- En cuanto al fósforo total mg/planta, los datos obtenidos se presentan en el cuadro 24 del apéndice. El ANDEVA para estos datos se muestra en el cuadro 25 del apéndice; en él se observa que este análisis dió significativo al 1% cuando se incluyó GA, y significativo al 5% cuando se excluyó este tratamiento. En la figura 11 del apéndice se muestra que las plantas abonadas alcanzaron niveles de fósforo total mucho mayores a los valores obtenidos por las plantas de los demás tratamientos, esta diferencia fue significativa al 1%. El resto de los tratamientos alcanzaron valores descendientes desde GM seguido por GSE, GRM, GR y finalmente G. En el cuadro 26 del apéndice se muestra que hay diferencia significativa al 5% entre los tratamientos GM y GSE con respecto a los tratamientos GR y G.

NOTA:

Es importante mencionar que una vez evaluadas las plantas de cada tratamiento, algunas de las plantas sobrantes permanecieron en el invernadero, y se encontró que una de las plantas del tratamiento GSE y dos del tratamiento GM, se fueron desarrollando rápidamente. A los quince días estas plantas habían alcanzado un tamaño mucho mayor y presentaban una coloración verde oscuro. Estas tres plantas se recogieron y se evaluaron, obteniéndose los resultados que se presentan en el cuadro 27 del apéndice.

El análisis de las raicillas de estas plantas mostró la presencia de gran cantidad de micelio tanto intracelular como intercelularmente, además se observó la presencia de gran cantidad de vesículas y de arbúsculae, lo que demuestra que se presentaba una micorrización abundante, y que a esa altura del proceso, las plantas presentaron una respuesta positiva a este tipo de asociación.

Como se observa en el cuadro 27, estas plantas alcanzaron valores muy altos de altura, peso seco, y fósforo total/planta. Esto nos indica que la presencia del micobionte resultó en una respuesta satisfactoriamente positiva por parte del hospedero, una vez que la micorrización se ha establecido abundantemente,lo cual, en esta investigación ocurrió días después de haberse evaluado las plantas.

DISCUSION

Al observar las fotografías tomadas a las siete semanas, se puede notar que a esta edad ya las plantas abonadas presentaban una diferencia muy notable en cuanto a tamaño, en relación a las plantas de los demás tratamientos, lo que nos indica que el abono suministrado a esas plantas resultó ser una fuente apropiada de elementos necesarios para su desarrollo. De los tratamientos restantes, GSE presentaba una altura mayor; esto puede deberse a que,como se observó en las raicillas analizadas, a las siete semanas estas plantas ya presentaban algo de micelio con vesículas y arbúsculas, lo que nos puede indicar que el proceso de micorrización estaba empezando a actuar y las plantas se empezaban a ver favorecidas por éste.

Presencia o ausencia de micorrización

El hecho de que no apareciera micorrización en los tratamientos G, GA y GR, nos indica que el proceso de esterilización del suelo utilizado, fue eficiente en la eliminación del micobionte nativo .

Se observó que a las cuatro semanas, aún no había ocurrido la formación de la micorriza.

A las siete semanas se estaba iniciando ya el proceso de micorrización, pues ya se encontraba micelio con vesículas y arbúsculas especialmente en las plantas que se encontraban en suelo no estéril. Esto nos indica que el micobionte nativo empezó a desarrollarse más rápidamente que el inoculado.

Fue a las doce semanas, cuando se observó un poco más de micorrización, es decir, mayor cantidad de micelio con vesículas y arbúsculas, especialmente en las plantas de GSE, es decir, las que poseían el inóculo nativo. También se observó micelio con algunas vesículas

y arbúsculas en los tratamientos GM y GRM. Sin embargo, por los resultados obtenidos, la respuesta de estas plantas hasta ese momento, no presentaba evidencia de un adecuado grado de micorrización como para juzgar que el micobionte utilizado sea el más apropiado para el hospedero empleado.

El hecho de que el proceso de micorrización en las plantas en suelo estéril resultara más lento que en las de suelo sin esterilizar, puede deberse a que, como menciona Mejstřick (1965), algunos microorganismos del suelo estimulan la germinación de los hongos micorrízicos V.A. Daniels,et al,(1976), mencionan que no está claro si los organismos estimulan la germinación directamente, o si está solo indirectamente influenciada por la actividad de esos microorganismos, tales como alteraciones nutricionales en el microambiente del suelo. Puede haber influído también el hecho de que ,como mencionan Trappe y Fogel (1978), los hongos que forman micorriza, difieren en varios aspectos, incluyendo el grado de susceptibilidad del hospedero.Aquí es importante mencionar que C.Infante (comunicación personal), encontró que el micobionte inoculado resultó más efectivo que el micobionte nativo.

Apariencia de las plantas

A las doce semanas, se observó que las plantas del tratamiento GA , eran vigorosas, con hojas grandes, verde oscuro. Se observó que las plantas de los restantes tratamientos, presentaban clorosis y defoliación abundantes, lo que nos indica que estaban siendo afectadas por la deficiencia del suelo especialmente en elementos como fósforo y nitrógeno. Sin embargo se observó que las plantas del tratamiento GSE eran las que habían perdido menor cantidad de hojas y presentaban menor grado de clorosis, esto puede deberse a la absorción y transferencia a la planta de elementos minerales, por parte del hongo micorrizante. Las plantas que crecían en suelo estéril sin ninguno de los endófitos, fueron las que se vieron más afectadas por la defoliación y la clorosis.

Altura de las plantas

Como se indicó, las plantas de gandul sembradas en un suelo pobre en fósforo, respondieron positivamente a la aplicación del abono químico, aumentando notoriamente el tamaño de las mismas. Esto coincide con lo reportado por Saxena y Yadav (1975) quienes encontraron que las aplicaciones de fosfatos en gandul han sido positivas y, en algunos casos altamente significativas.

La diferencia obtenida entre GSE respecto a los restantes tratamientos, puede deberse a que, como se determinó, las plantas de este tratamiento presentaban mayor cantidad de micelio, con vesículas y arbúsculas, o sea que ocurrió la micorrización nativa y las plantas mostraron su respuesta en crecimiento. Los restantes tratamientos no presentaron diferencia significativa entre ellos,sin embargo las plantas más pequeñas fueron las del tratamiento GRM en que al parecer, la inoculación con Rhizobium y micorriza afectó en sus primeras etapas, el crecimiento de la planta; en otras palabras , puede decirse que las primeras etapas de infección y competencia entre Rhizobium y el micobionte,no inducen precisamente un estado de mayor desarrollo.

Area foliar

Las plantas abonadas, al tener una altura mucho mayor,también presentaron hojas de mayor tamaño,pues tenían una fuente adicional óptima de nutrientes. Se observó que de los restantes tratamientos GRM fue el que alcanzó el mayor valor ,diferente significativamente al alcanzado en los demás. Esto puede indicarnos que la presencia de los dos simbiontes, aunque afectaron inicialmente el crecimieto de las plantas, fue un factor que permitió un mayor desarrollo de las hojas. Se notó que las plantas testigo (G),fueron las que obtuvieron el menor valor de área foliar; esto nos demuestra que fueron afectadas por la deficiencia del suelo, al no contar con fijación de nitrógeno por Rhizobium, ni con micorrización

Peso seco de la parte aérea

Las plantas abonadas,al ser las de mayor tamaño,lógicamente presentaron el mayor valor de peso seco foliar. De los restantes tratamientos, se observó que GSE alcanzó el valor más alto,lo que se explica pues estas plantas al finalizar el experimento,presentaban mayor cantidad de hojas que las de los tratamientos GM,GR,GRM y G, además de que comparadas con estos tratamientos, ellas fueron las que alcanzaron mayor altura. Las plantas que se encontraban en suelo estéril,sin inóculo (G),al finalizar el experimento fueron las que habían perdido mayor cantidad de follaje,como producto de la deficiencia de nutrientes en el suelo, por lo que obtuvieron el menor valor de peso seco.

Peso seco del sistema radical

Al igual que en los demás parámetros,el mayor valor de peso seco radical fue obtenido por las plantas abonadas que fueron las que desarrollaron un sistema radical más vigoroso. De los restantes tratamientos GSE alcanzó el mayor valor,sin embargo, no difirió con respecto a GR, GM y GRM,pero sí presentaron diferencia significativa con respecto a las plantas testigo,que fueron las que obtuvieron menor peso seco radical,pues crecieron pobremente.

Número y peso seco de los nódulos

Aquí hay que destacar el hecho de que, aparecieron nódulos en las raíces de las plantas en tratamientos como GA,GM y G, donde no se esperaba,lo que nos indica que existió contaminación o el proceso de esterilización no fue suficiente para eliminar totalmente a la bacteria.Inicialmente se había montado este experimento en suelo esterilizado solo con bromuro de metilo y apareció Rhizobium en tratamientos en los cuales no debía de aparecer. Por tal motivo, se procedió a traer nuevo sustrato y esterilizarlo con bromuro y autoclave; sin embargo aparecieron nódulos en GA,G y GM por lo que esta variable se evaluó en todos los tratamientos. Esta contaminación pudo deberse a

la entrada de polvo,pues el invernadero tenía gran parte forrada solo con cedazo, además,por la misma consistencia del suelo,algunas bacterias sobrevivieron en terrones formados en él.

Se observó que las plantas abonadas fueron las que formaron mayor número de nódulos,siendo éstos de mayor tamaño que los encontrados en los demás tratamientos, además eran de una coloración rojiza en su interior,lo que nos indica la presencia de la leghemoglobina,sustancia coloreada que tiene función importante en la fijación de nitrógeno. Esta mejor nodulación y fijación de nitrógeno en suelo abonado se debe a que el suelo tenía una fuente adicional de elementos como fósforo y nitrógeno que fueron fácilmente utilizados por la bacteria. Como menciona Fassbender (1975), el fósforo es un elemento muy importante en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno por Rhizobium.

Las plantas en suelo sin esterilizar GSE,también alcanzaron alto número y peso seco de los nódulos,lo que nos indica que en el suelo utilizado existe la bacteria Rhizobium en forma nativa,la cual nodula al gandul. Las especies nativas generalmente tienen una alta capacidad competitiva,como mencionan Brockwell (1981) y Weaver y Frederick (1974). Los tratamientos que siguieron en cuanto a número de nódulos y peso seco de ellos, fueron GR y GRM,es decir,aquellos en los cuales se había inoculado una cepa de Rhizobium que se estima efectiva. Los tratamientos que alcanzaron menores valores en estas dos variables fueron GM y G,lo que nos indica que en el suelo estéril,las bacterias nativas que sobrevivieron a la esterilización,no tuvieron la oportunidad de nodular fácilmente al gandul,por encontrarse en un suelo extremadamente pobre en elementos esenciales como lo son el fósforo y el nitrógeno.

Nitrógeno total miligramos/planta.

Como era de esperar,las plantas abonadas fueron las que obtuvieron mayor valor de nitrógeno total,por cuanto tenían una fuente adicional de este elemento en el abono. De los restantes tratamientos GR,GRM,y GM , alcanzaron valores muy similares entre sí,un poco superior a las testigo, esto nos puede indicar que la presencia del

Rhizobium inoculado colaboró en parte con la fijación de nitrógeno, sin embargo, aún cuando se considera una cepa eficiente, no actuó así en la fijación de nitrógeno, pues el suelo era extremadamente pobre en fósforo, y la fijación simbiótica de nitrógeno tiene un alto requerimiento de este elemento. El valor obtenido por GM, puede deberse a que el hongo micorrizante, con sus hifas externas colaboró en la absorción y transferencia de elementos nitrogenados a la planta . El bajo valor alcanzado por GSE puede deberse a que el Rhizobium nativo supuestamente es una cepa poco eficiente en la fijación de N_2. Esto coincide con lo propuesto por varios investigadores en el sentido de que Rhizobium nativo presenta una alta capacidad competitiva y, a su vez, una baja capacidad fijadora de nitrógeno (Wever y Frederick,1974; Obaton,1977; Stowers y Elkan,1980). También puede haber influido el hecho de que al ser un suelo no estéril los microorganismos también van a utilizar parte del nitrógeno del suelo, estando así este elemento en menor disponibilidad para la planta.

Fósforo total mg/planta

Las plantas abonadas alcanzaron el mayor valor pues tenían a este elemento disponible en el abono. Los valores alcanzados por GM y GSE se explican pues las plantas de estos tratamientos eran las que presentaban mayor micorrización y como mencionan Rhodes y Gerdemann (1980), las plantas micorrizadas tienen acceso a un volumen mayor de suelo del cual pueden obtener fósforo. El valor de GRM nos puede indicar que la presencia de Rhizobium y su posible competencia con el micobionte,puede haber afectado en parte el efecto de la micorrización inicial,y por ende, la absorción de fósforo.Los tratamientos que no contaban con el micobionte fueron las que alcanzaron el menor valor.

CONCLUSIONES

Tomando en cuenta las condiciones bajo las cuales se realizó esta investigación, y los resultados en ella obtenidos, se puede concluir:

1- Cajanus cajan (frijol gandul), es un cultivo que en suelos deficientes, responde positivamente a la aplicación de abono químico.

2- La micorrización del gandul con el micobionte inoculado, fue un proceso más lento que con el micobionte nativo, por lo cual no se amerita su inoculación en el suelo utilizado.

3- La efectividad del Rhizobium nativo, en la fijación de nitrógeno, fue muy inferior a la del inóculo utilizado.

4- La actividad de los endófitos micorrízico y Rhizobium se vió muy afectada por la extrema deficiencia del suelo en elementos como nitrógeno y fósforo, por lo que la respuesta de las plantas no fue muy satisfactoria.

5- Para la mayoría de las variables la presencia de los endófitos tanto nativos como inoculados, beneficiaron en algún grado al hospedero, en comparación con el testigo.

6- En suelos tropicales, deficientes en fósforo, la utilización de las micorrizas, puede servir como un medio para disminuir la cantidad de abono necesarios, pero no para evitar totalmente el uso de ellos.

RECOMENDACIONES

1- Debido a que durante la realización de esta investigación se presentaron algunos inconvenientes en el invernadero como por ejemplo ; al ser un invernadero"abierto" (forrado con cedazo), eso permite la entrada de polvo y esporas que contaminan ; por tanto es importante, cuando se intenten hacer otras investigaciones de este tipo, conseguir un lugar que ofrezca las condiciones mínimas necesarias para trabajar en forma adecuada.

2- Es recomendable realizar diversos ensayos,para determinar, en suelos deficientes en fósforo y otros elementos, la cantidad necesaria de ellos en el abono, que no inhiban, sino que favorezcan la acción simbiótica.

3- Se sugiere la necesidad de realizar un estudio sistemático en Costa Rica, para determinar las diferentes especies de hongos micorrizantes vesículo-arbusculares que existen, y que puedan ser utilizados como elementos de investigación.

4- Es importante realizar estudios para determinar la acción más benéfica de parte de diferentes especies de hongos micorrízantes V.A., en diferentes hospederos, especialmente de valor económico e industrial.

RESUMEN

Se hizo un estudio en un invernadero de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como un primer intento para determinar si es posible producir en el invernadero, la doble asociación simbiótica Rhizobium-hongo micorrizante en plantas de Cajanus cajan (frijol gandul), para tratar de obtener plantas con un mayor significado alimenticio a un menor costo.

Se montaron los siguientes tratamientos:

GSE-Plantas de gandul en suelo sin esterilizar, sin inocular

G -Plantas de gandul en suelo estéril,sin inocular (testigo)

GA -Plantas de gandul en suelo estéril,abonadas.

GR -Plantas de gandul en suelo estéril,inoculadas con Rhizobium

GM -Plantas de gandul en suelo estéril,inoculadas con hongo micorrizante

GRM-Plantas de gandul en suelo estéril,inoculadas con Rhizobium y con hongo micorrizante.

Los parámetros evaluados fueron:

1- altura de las plantas, evaluada semanalmente (cm)
2- área foliar (cm^2)
3- peso seco de la parte aérea (g)
4- peso seco del sistema radical (g)
5- número de nódulos
6- peso seco de los nódulos (mg)
7- nitrógeno y fósforo total (mg/planta)
8- determinación de presencia o ausencia de micorriza.

La evaluación de estos parámetros se realizó a las doce semanas, y se encontró que para todos los parámetros evaluados, las plantas abonadas alcanzaron valores mucho más altos a los de las plantas de los restantes tratamientos.

En relación a las plantas inoculadas con micorriza, se encontró que en ellas el proceso de micorrización fue más lento que en el caso de las plantas que crecieron en suelo sin esterilizar en las cuales el micobionte nativo micorrizó más rápidamente a las plantas lo que resultó en una respuesta de las mismas en cuanto a tamaño, peso seco de la parte aérea y fósforo total.

Las plantas inoculadas con Rhizobium obtuvieron valores de nitrógeno total , mayores a los alcanzados por las plantas en suelo sin esterilizar, lo que nos indica que el Rhizobium inoculado resultó más eficiente que el nativo, en cuanto a fijación de nitrógeno.

Las plantas que crecieron en suelo estéril y sin inóculo fueron las que se vieron más afectadas por la deficiencia del suelo

LITERATURA CITADA

Aldon,E.F. 1975. Endomycorrhizae enhance survival and growth of four-wing saltbush on coal mine spoils. US For.Serv.Res. Note RM-294.

Alexander,M. 1977. Introduction to soil microbiology. 2°ed. New York, John Wiley & sons. 467P.

Asimi,S.,Gianinazzi-Pearson,V.,Gianinazzi,S. 1980. Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and Rhizobium in soybeans . Can.J.Bot. 58:2200-2205.

Azcon-G de A.C. y Barea,J.M. 1980. Micorrizas. Investigación y Ciencia. N° 47:8-16.

Ballati,A. sf. Producción de inoculantes. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Fermentaciones Industriales. Facultad de Ciencias Exactas. La Plata. 20P.

Bartlett,E.M., y Lewis,D.H. 1973. Surface phosphatase activity of mycorrhizal roots of beech. Soil.Biol.Biochem. 5:249-257.

Bevege,D.T., y Bowen,G.D. 1975. Endogone strain and host plant differences in development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. pp:77-86. In: Sanders,F.E.,Mosse,B. y Tinker,P.B.(eds). Endomycorrhizas. Academic Press,New York.

Bonfante-Fasolo,P. 1980. Occurrence of a Basidiomycete in living cells of mycorrhizal hair roots of Calluna vulgaris . Trans.Br.Mycol.Soc. 75:320-325.

Bowen,G.D. 1973. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. pp:151-205 In: Marks,G.C., y Koslowski,T.T. (eds). Ectomycorrhizae,Their ecology and physiology. Academic Press, New York.

Bowen,G.D.,Skinner,M.F.,y Bevege,D.I. 1974. Zinc uptake by myco - rrhizae and uninfected roots of Pinus radiata and Araucaria cunninghamii. Soil.Biol.Biochem. 6:141-144.

Briceño,J.A.,Pacheco,R.,González,M.A., y Lopez,C. 1984. Métodos a nalíticos para el estudio de suelos y plantas. Centro de In - vestigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. 137P.

Brockwell,J.A.1974. Ecology and legume-rizobia associations. Reprin ted from the Prececding of the I dian Natural Sc. 40.B (6):687-699.

Brockwell,J.A. 1981. A strategy for legume nodulation research in developing regions of the old world. Plant and Soil. 58:367-382.

Carling,D.E.,Riehle,W.G., Brown,M.F.,Johnson,D.R. 1978. Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on nitrate reduc- tase and nitrogenase activities in nodulating and non-nodula - ting soybeans. Phytopathology. 68:1590-1596.

Cartwright,P.M. 1967. The effect of combined nitrogen on the growth and nodulation of excised roots of Phaseolus vulgaris L. Annals of Botany. 31(122):309-321.

Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1973. El potencial del frijol y de otras leguminosas de grano comestible en Améri ca Central. Colombia. 270P.

Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1982. Informe Tri- mestral de Investigación y Cooperación Internacional. 1(2).

Chavez,S.A.,Nuñez,E.R. y Echegaray,A.A. 1977. Efecto de la ferti- lización con N,P,Mo, y Fe: y del manejo de dos cepas de inocu- lante (Rhizobium phaseoli),sobre la nodulación del frijol (Pha seolus vulgaris L.) Agrociencia. 27:79-94.

Cooper,K.M., y Tinker,P.B. 1978. Translocation and transfer of nu - trients in vesicular-arbuscular mycorrhizas.II.Uptake and trans location of phosphorus,zinc and sulphur. New Phytol.81:43-52.

Cox,G., y Sanders,F.E. 1974. Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. New Phytol. 73:901-12.

Cox,G., y Tinker,P.B. 1976. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study. New Phytol . 77:371-378.

Cox,G.,Sanders,F.E.,Tinker,P.B., y Wild,J.A. 1975. Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. pp:298-312. In: Sanders,F.E., Mosse,B., y Tinker,P.B.(eds). Endomycorrhizas. Academic Press, New York.

Crush,J.R. 1974. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII .Growth and nodulation of some herbage legumes. New Phytol. 73:743-749.

Daft,M.J., y El-Giahmi,A.A. 1974. Effect of Endogone mycorrhiza on plant growth. VII. Influence of infection on the growth and nodulation in French bean (Phaseolus vulgaris). New Phytol. 73: 1139-1147.

Daft,M.J., y El-Giahmi,A.A. 1975. Effects of Glomus infection on three legumes. pp:581-592. In: Sanders,F.E., Mosse.B., y Tinker, P.B. (eds). Endomycorrhizas. Academic Press, New York.

Daft,M.J., y El-Giahmi,A.A. 1976. Studies on nodulated and mycorrhizal peanuts. Am.Appl.Biol. 83:273-276.

Daft,M.J., y Nicolson,T.H. 1969. Effect of Endogone mycorrhiza on plant growth. II. Influence of soluble phosphate on endophyte and host in maize. New Phytol. 68:945-952.

Daft,M.J., y Nicolson,T.H. 1972. Effect of Endogone mycorrhiza on plant growth. IV. Quantitative relationships between the growth of the host and the development of the endophyte in tomato and maize . New Phytol. 71:287-295.

Daniel,W.W. 1980. Biogestadística : Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Traducido por Pérez,J.H. Editorial Limusa (México). 485 P.

Daniels,B.A., y Trappe,J.M. 1980. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus epigaeus. Mycología. 72(3):457-471.

Dazzo,F.B. 1980. Infection processes in the Rhizobium-legume symbio - sis. pp:49-50. In: Summerfield,R.J., y Bunting,A.M. (eds). Ad - vance legume science, Royal Botanic Gardens.Kew,Richmond,Surrey twg av, England.

Erdman,L.W. 1948. Legume inoculation :what it is; what does? US Depart ment of Agriculture. Framer's bulletin N° 2003. 20 P.

Fassbender,H.W. 1975. Química de suelos. Instituto interamericano de ciencias agrícolas de la O.E.A. Turrialba, Costa Rica. 398 P.

Fournier,Z.R. 1977. Efecto de la suplementación con metionina y trip- tofano sobre el valor nutritivo del frijol gandul (Cajanus cajan) utilizado como fuente de proteina. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. San José.Costa Rica.

Frank,A.B. 1885. Ueber die auf wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze.Ber.Deut.Bot.Ges. 3:128.

Frederick,L.R. 1978. Effectiveness of rhizobia-legume associations . pp:265-276. In: Andrew,C.S., y Kamprath,F.J. (eds). Mineral nu trition of legumes in tropical soils. Melbourne , CSIRO Press .

Furlan,V., y Fortin,J.H. 1973. Formation of endomycorrhizae by Endogo ne calospora on Allium cepa under three temperature regimes . Naturaliste can. 100:467-477.

Furman,T.E., y Trappe,J.M. 1971. Phylogeny and ecology of mycotrophic achlorophyllous angiosperms. Q.Rev.Biol. 46:219-225.

Gallaud,I. 1905. Etudes sur les mycorrhizes endotrophes. Rev.Gén.Bot. 17:5-48

Gerdemann,J.W. 1968. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth Annu.Rev.Phytopathol. 6:397-418

Gerdemann,J.W. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. pp:575-591 . In: Torrey,J.G., y Clarkson,D.T. (eds). The Development and Func tion of Roots. Academic Press, New York.

Gerdemann,J.M., y Nicolson,T.H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Brit.Mycol.Soc. 46:235-244.

Gerdemann,J.M., y Trappe,J.M. 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycol.Mem. N°5:1-76.

Gianinazzi-Pearson,V., y Gianinazzi,S. 1976. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Effect of mycorrhiza formation and phosphorus nutrition on soluble phosphatase activity in onion roots. Physiol.Veg. 14:833-841.

Gianinazzi-Pearson,V., y Gianinazzi,S. 1978. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. Soluble phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. Physiol. Plant Pathol. 12:45-53.

Gilmore,A.E. 1971. The influence of endotrophic mycorrhizae on the growth of peach seedlings. J.Amer.Soc.Hortic.Sci. 96:35-38.

Graham,P.H. 1977. La nodulación y la fijación de nitrógeno en Phaseolus vulgaris. Centro Internacional de Agricultura Tropical . Cali, Colombia. 20 P.

Graham,P.H., y Halliday,J. 1977. Inoculation and nitrogen fixation in the genus Phaseolus. pp:313-334. In: Vincent,J.M.,Whitney,A. S., y Bose,J. (eds). Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in the tropical agriculture. Hawaii, College of Tropical Agriculture. Miscellaneous Publication 145.

Gray,L.E., y Gerdemann,J.W. 1969. Uptake of phosphorus-32 by vesicular-arbuscular mycorrhizae. Plant Soil. 30:415-422 .

Gray,L.E., y Gerdemann,J.W. 1973. Uptake of sulphur-35 by vesicular-arbuscular mycorrhiza. Plant Soil. 39:687-689.

Green,N.E., Graham,S.O., y Schenck,N.C. 1976. The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. Mycología. 68:929-933.

Hadley,G. 1975. Organization and fine structure of orchid mycorrhiza. pp:335-351. In: Sanders,F.E., Mosse,B., y Tinker,P.B. (eds) . Endomycorrhizas. Academic Press , New York.

Harley,J.L. 1969. The biology of mycorrhiza. Leonard Hill, London . 334 P.

Harley,J.L. 1971. Fungi in ecosystems. J.Appl.Ecol. 8:627-642.

Hattingh,M.J.,Gray,L.E., y Gerdemann,J.W. 1973. Uptake and translocation of ^{32}P-labeled phosphate to onion roots by endomycorrhizal fungi. Soil Sci. 116:383-387.

Hayman,D.S. 1970. Endogone spore number in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. Trans.Brit.Mycol.Soc. 54:53-63.

Hayman,D.S. 1974. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VI. Effect of light and temperature. New Phytol. 73: 71-80.

Hepper,C.M., y Smith,G.A. 1976. Observations on the germination of Endogone spores. Trans.Brit.Mycol.Soc. 66:189-194.

Ho,I., y Trappe,J.M. 1973. Translocation of ^{14}C from Festuca plants to their endomycorrhizal fungi. Nature New Biol. 244:30-31.

Holley,J.D., y Peterson,R.L. 1979. Development of a vesicular-arbuscular mycorrhiza in bean roots. Can.J.Bot. 57:1960-1978.

Jackson,N.E., Miller,R.H., y Franklin,R.E. 1973. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on uptake of ^{90}Sr from soil by soybeans. Soil Biol.Biochem. 5:205-212.

Janse,J.M. 1896. Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanaises. Ann. de Jard.Bot. de Buitenzorg. 14:53-212.

Kay,D.E. 1979. Food Legumes.Tropical Products Institute. Crop and Product.Digest. N°3. London. 435 P.

Kelley,A.P. 1950. Mycotrophy in plants. Chronica Botanica Co.,Waltham Mass.223 P.

Khan,A.G. 1972. The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations on growth of cereals. I. Effects on maize growth. New Phytol. 71:613-619.

Khan,A.G. 1975. Growth effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on crops in the field. pp:419-436. In: Sanders,F.E.,Mosse,B., y Tinker,P.B.(eds). Endomycorrhizas. Academic Press, New York.

Kinden,D.A., y Brown,M.F. 1975. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. III. Host-endophyte interactions during arbuscular development. Can.J.Microbiol. 21: 1930-1939.

Kinden,D.A., y Brown,M.F. 1976. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. IV. Host-endophyte interactions during arbuscular deterioration. Can.J.Microbiol. 22:64-75.

Kruckelmann,H.W. 1975. Effects of fertilizers, soils, soil tillage , and plant species on the frecuency of Endogone chlamydospores and mycorrhizal infection in arable soils. pp:511-526. In: Sanders,F.E.,Mosse,B. y Tinker,P.B. (eds). Endomycorrhizas. Academic Press, New York.

La Rue,J.H.,Mc Clellan,W.D., y Peacock,W.L. 1975. Mycorrhizal fungi and peach nursery nutrition. Calif.Agric. 29:6-7.

Leon,J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales . IICA. de la O.E.A., San José. Costa Rica.

Lewis,D.H. 1973. Concepts in fungal nutrition and their origin of biotrophy. Biol.Rev. 48:261-278.

Ling-Lee,M.,Chilvers,G.A., y Ashford,A.E. 1975. Polyphosphate granules in three different kinds of tree mycorrhiza. New Phytol , 75:551-554.

Marks,G.C., y Kozlowski,T.T. 1973. Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology. Academic Press, New York. 444 P.

Maronek,D.A.,Hendrix,J.W., y Kiernan,J. 1981. Mycorrhizal fungi and their importance in hortivultural crop production. Hort.Rev. 3:172-213.

Marx,D.H. 1973. Mycorrhizae and feeder root diseases, pp:351-382 . In: Marks,G.C., y Kozlowski,T.T. (eds). Ectomycorrhizae-Their ecology and physiology. Academic Press, New York.

McLuckie,J., y Burgess,A. 1932. Mycotrophism in Rutaceae.I. The mycorrhiza of Eriostemmon crowei. Proc.Linn.Soc. N.S. Wales . 57: 291-312.

Mejstřik,J. 1965. Study of the development of endotrophic mycorrhiza in the association of Cladientum marisci, pp:283-290. In: Macura,J., y Vančura,V. (eds). Plant microbe relationships . Czech.Acad.Sci.,Prague.

Mejstřik,V. 1970. The uptake of ^{32}P by different kinds of ectotrophic mycorrhiza of Pinus. New Phytol. 69:295-298.

Mejstřik,J. 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Annu.Rev.Phytopathol. 11:171-196.

Menge,J.A., La Rue,J., Labanauskas,C.K., y Johnson,L.L. 1980. The effect of two mycorrhizal fungi upon growth and nutrition of avocado seedlings grown with six fertilizer treatments. J.Amer. Soc.Hort.Sci. 105 3):400-404.

Menge,J.A., Steirle,D.,Bagyaraj,D.J.,Johnson,E.L., y Leonard,R.T. 1978. Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. New Phytol. 80:575-578.

Mexal,J., y Reid,C.P. 1973. The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. Can.J.Bot. 51:1579-1588.

Meyer,F.H. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests, pp:79-106. In: Marks,G.C., y Kozlowski,T.T.(eds). Ectomycorrhizae-Their ecology and physiology. Academic Press , New York.

Mosse,B. 1963. Vesicular-arbuscular mycorrhiza: an extreme form of adaptation. Symp.Soc.Gen.Microbiol. 13:146-170.

Mosse,B. 1972. The influence of soil type and Endogone strain on the growth of mycorrhizal plants in phosphate deficient soils . Rev.Ecol.Biol.Sol. 9:529-537.

Mosse,B. 1973a. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Ann.Rev.Phytopathol. 11:171-196.

Mosse,B. 1973b. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. In soil given additional phosphate. New Phytol . 72:127-136.

Mosse,B. 1977. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. X.Responses of Stylosanthes and maize to inoculation in unsterile soils. New Phytol., 78:277-288.

Mosse,B. y Phillips,J.M. 1971. The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. J.Gen.Microbiol. 69:157-166.

Mosse,B.,Powell,C.L., y Hayman,D.S. 1976. Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza IX. Interactions between V.A. mycorrhiza rock phosphate and symbiotic nitrogen fixation. New Phytol. 76:331-342.

Munns,D.M. 1978. Soil acidity and nodulation, pp:247-263 . In: Andrew, C.S., y Kamprath,F.J. (eds). Mineral nutrition of legumes in tropical soils. Melbourne, CSIRO Press.

Nicolson,T.H. 1967. Vesicular-arbuscular mycorrhiza- a universal plant symbiosis. Sci.Prog., Oxf. 55:561-581.

Nutman,P.S. 1970. The relation between nodule bacteria and the legume. In: Baker,K.F., y Snyder,N (eds). Ecology of soil-borne plant patogens. University of California Press, Berkeley.

Obaton,M. 1977. Effectiveness, saprophytic and competitive ability . Three properties of Rhizobium esential for increasing the yield of inoculated legumes. pp:127-133. In: Ayanaba,A,, y Dart,R.J. (eds). Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropical. New York,Wiley.

Olsen,S.A. 1972. Micronutrient interactions. pp:243-264. In: Mortvedt, J.J., Giordano,P.M., y Lindsay,W.L. (eds). Micronutrients in agriculture. Soil Science Society of America, Madison,Wis.

Peterson ,T.A., Mueller,N.C., y Englander,L. 1980. Anatomy and ultrastructure of a Rhododendron root-fungus association. Can.J.Bot. 58:2421-2433.

Phillips,J.M., y Hayman,D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans.Brit.Mycol.Soc. 55:158-161.

Powell,C.Ll. 1975. Potassium uptake by endotrophic mycorrhizas. pp: 461-468. In: Sanders,F.E.,Mosse,B., y Tinker,P.B. (eds). Endomycorrhizas. Academic Press, New York.

Rambelli,A. 1973. The rhizosphere of mycorrhizae, pp:299-349. In: Marks,G.C. y Kozlowski,T.T.(eds). Ectomycorrhizae-Their ecology and physiology. Academic Press, New York.

Read,D.J. 1974. Pezizella ericae sp.nov.,the perfect state of a typical mycorrhizal endophyte of Ericacea. Trans.Br.Mycol.Soc. 63:381-419.

Redhead,J.F. 1971. Endogone and endotrophic mycorrhizae in Nigeria . XV. IUFRO Congress,Gainesville. 25 P.

Reisenaver,H.M. 1966. Mineral nutrients in soil solution. pp:507-508. In: Altman,P.S., y Dittmer,D.S.(eds). Environmental biology . Federation of American Societies for Experimental Biology,Bethesda,Md.

Reyes,C.P. 1980. Bioestadística aplicada. Editorial Trillas. México. 217 P.

Rhodes,L.H., y Gerdemann,J.W. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhyzal onions. New Phytol. 75:555-561.

Rhodes,L.H., y Gerdemann,J.W. 1978a. Translocation of calcium and phosphate by external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Soil Sc. 126:125-126.

Rhodes,L.H., y Gerdemann,J.W. 1978b. Hyphal translocation and uptake of Sulfur by vesicular-arbuscular mycorrhizae of onion. Soil Biol. Biochem. 10:355-360.

Rhodes,L.H., y Gerdemann,J.W. 1980. Nutrient translocation in Vesicular-arbuscular Mycorrhizae, In: Cook,Cl.B.,Pappas,P.W., y Rudolph, E.D. (eds). Cellular Interactions in Symbiosis and Parasitism . The Ohio State University Press, Columbus,Ohio. 305P.

Rodríguez,S.J. 1978. Determinación del punto óptimo de cocción del frijol gandul (Cajanus cajan) para su utilización en la alimentación animal. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Costa Rica. Facultad de Agronomía. San José, Costa Rica. 72 P.

Ross,J.P., y Harper,J.A. 1970. Effect of Endogone mycorrhiza on soybean yields. Phytopathology. 60:1552-1556.

Ross,J.P., y Ruttencutter,R. 1977. Population dynamics of two vesicular endomycorrhizal fungi and the role of hyperparasitic fungi. Phytopathology. 67:490-496.

Ruehle,J.L., y Marx,D.H. 1979. Fiber,food,fuel,and fungal symbionts. Science. 206:419-422.

Ruschel,A.P., y Reuszen,H.W. 1973. Fatores que afectam a simbiose Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 8:287-292.

Ruschel,A.P., y Ruschel,R. 1975. Avaliacao da fixacao simbiótica de nitrogenio em feijao. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 10:11-17.

Safir,G.R., Boyer,J.S., y Gerdemann,J.W. 1971. Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. Science. 172:581-583.

Safir,G.R.,Boyer,J.S., y Gerdemann,J.W. 1972. Nutrient status and mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. Pl.Physiol. 49:700-703.

Sanders,F.E. 1975. The effect of foliar-applied phosphate on the mycorrhizal infections of onion roots. pp:261-276. In: Sanders,F. E.,Mosse,B., y Tinker,P.B.(eds). Endomycorrhizas. Academic Press, New York.

Sanders,F.E., y Tinker,P.B. 1971. Mechanism of absoprtion of phosphate from soil by Endogone mycorrhizas. Nature. 233:278-279.

Sanders,F.E., y Tinker,P.B. 1973. Phosphate flow into mycorrhizal roots. Pestic.Sci. 4:385-395.

Sanders,F.E.,Tinker,P.B.,Black,R.L., y Palmerley,S.M. 1977. The development of endomycorrhizal root systems. I. Spread of infection and growth promoting effects with four species of vesucular-arbuscular endophyte. New Phytol. 78:257-268.

Saxena,M.C., y Yadav,D.S. 1975. Some agronocic considerations of pigeon pea and chickpeas. International workshop on grain Legumes. pp:31-59.

Schenck,N.C., y Schroder,V.N. 1974. Temperature response of Endogone mycorrhiza on soybean roots. Mycología. 66(4):600-605

Schenck,N.C., y Smith,G.S. 1982. Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida, Mycología. 74(1):77-92.

Schenck,N.C.,Graham,S.O., y Green,N.E. 1975. Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycología. 67(6):1189-1192.

Schoknecht,J.D., y Hattingh,M.J. 1976. X-ray microanalysis of elements in cells of V.A. mycorrhizal and nonmycorrhizal onions. Mycología. 68:296-303.

Seviour,R.J.,Willing,R.R., y Chilvers,G.A. 1973. Basidiocarps associated with ericoid mycorrhizas. New Phytol. 72:381-385.

Sinka,S.K. 1978. Las leguminosas alimenticias; su distribución, su capacidad de adaptación y biología de los rendimientos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.

Slankis,V. 1973. Hormonal relationships in mycorrhizal development, pp:231-298. In: Marks,G.C., y Kozlowski (eds). Ectomycorrhizae-Their ecology and physiology. Academic Press, New York.

Smith,S.E., y Daft,M.J. 1977. Interactions between growth, phosphate content and N_2 fixation in mycorrhizal and non-mycorrhizal Medicago sativa (alfalfa). Austr.J.Pl.Physiol.

Stowers,K.L., y Elkan,G.H. 1980. Criteria for selecting ineffective and effective strains of Rhizobium for use in the tropical agriculture, North Carolina, Agricultural Research Service. Tecnical Bulletin N° 264. 73 P.

Sutton,J.C. 1973. Development of vesicular-arbúscular mycorrhizae in crop plants. Can.J.Bot. 51:2487-2493.

Timmer,L.W., y Leyden,R.F. 1978. Stunting of citrus seedlings in fumigated phosphorus fertilization and inoculation with mycorrhizal fungi. J.Amer.Soc.Hortic.Sci. 103:533-537.

Tinker,P.B. 1975. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on higher plants. Symp.Soc.Expt.Biol. 29:325-349.

Trappe,J.M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Bot. Rev. 28:538-606.

Trappe,J.M. 1964. Mycorrhizal hosts and distribution of Cenococcum graniforme. Lloydia. 27:100-106.

Trappe,J.M. 1971. Mycorrhiza-forming Ascomycetes, pp:19-37. In: Hacskaylo,E. (ed). Mycorrhizae. USDA, For.Serv.Misc.Publ. N°:1189 Washington.D.C.

Trappe,J.M., y Fogel,R.D. 1978. Ecosistematic functions of mycorrhizae. In: Marshall,J.K.(ed). The below ground symposium: a synthesis of plant-associated processes. Col.State Univ.Range Sci. Dep. Sci.Ser. 26:205-214.

Trinick,M.J. 1977. Vesicular-arbuscular infection and soil phosphorus utilization in Lupinus spp. New Phytol. 78:297-304.

Vidor,C. sf. Microbial restraints on legume symbiosis. Porto Alegre, Brasil. Universidad Federal de Ría Grande da Sul, Departamento de Solo. 23 P.

Warcup,J.H. 1975. Factors affecting symbiotic germination of orchid seed. pp:87-104. In: Sanders,F.E.,Mosse,B., y Tinker,P.B.(eds). Endomycorrhizas. Academic Press, New York.

Weaver,R.W., y Frederick,L.R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of Glycine max.L.Merrill. II. Field studies. Agronomy Journal. 66:232-236.

Zak,B. 1974. Ectendomycorrhiza of Pacific madrone (Arbutus menziesii). Trans.Br.Mycol.Soc. 62(1):202-204

APENDICE

CUADRO 1 : Análisis físico-químico del suelo utilizado.

Característica		Valor
Arena	%	34
Limo	%	30
Arcilla	%	36
Nombre textural		Franco-arcilloso
pH		5.5
P	ug/ml de suelo	2.0
Al	meq/100 ml suelo	0.15
Ca	" " " "	10.5
Mg	" " " "	4.3
K	" " " "	1.03
Cu	ug/ml de suelo	20.0
Mn	" " " "	13.0
Zn	" " " "	4.8

CUADRO 2 : Altura promedio (cm) de las plantas, tomada semanalmente.

	Semanas											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Tratamient.												
GSE	5.45	10.95	14.97	17.09	18.92	21.04	21.89	23.44	24.81	25.51	27.34	28.00
G	4.32	8.96	12.89	15.41	17.65	20.17	21.35	22.25	22.46	22.57	23.47	23.85
GA	3.29	7.57	13.34	19.24	24.19	32.45	39.65	48.50	55.45	61.01	66.32	69.55
GR	2.1	3.85	6.6	11.29	14.76	17.97	19.66	21.19	21.86	22.25	23.55	24.34
GM	3.47	7.86	12.35	14.99	17.75	19.89	21.04	22.04	22.30	22.41	24.00	24.66
GRM	2.66	4.11	6.35	10.07	12.46	15.47	17.60	19.37	20.45	20.84	21.92	22.24

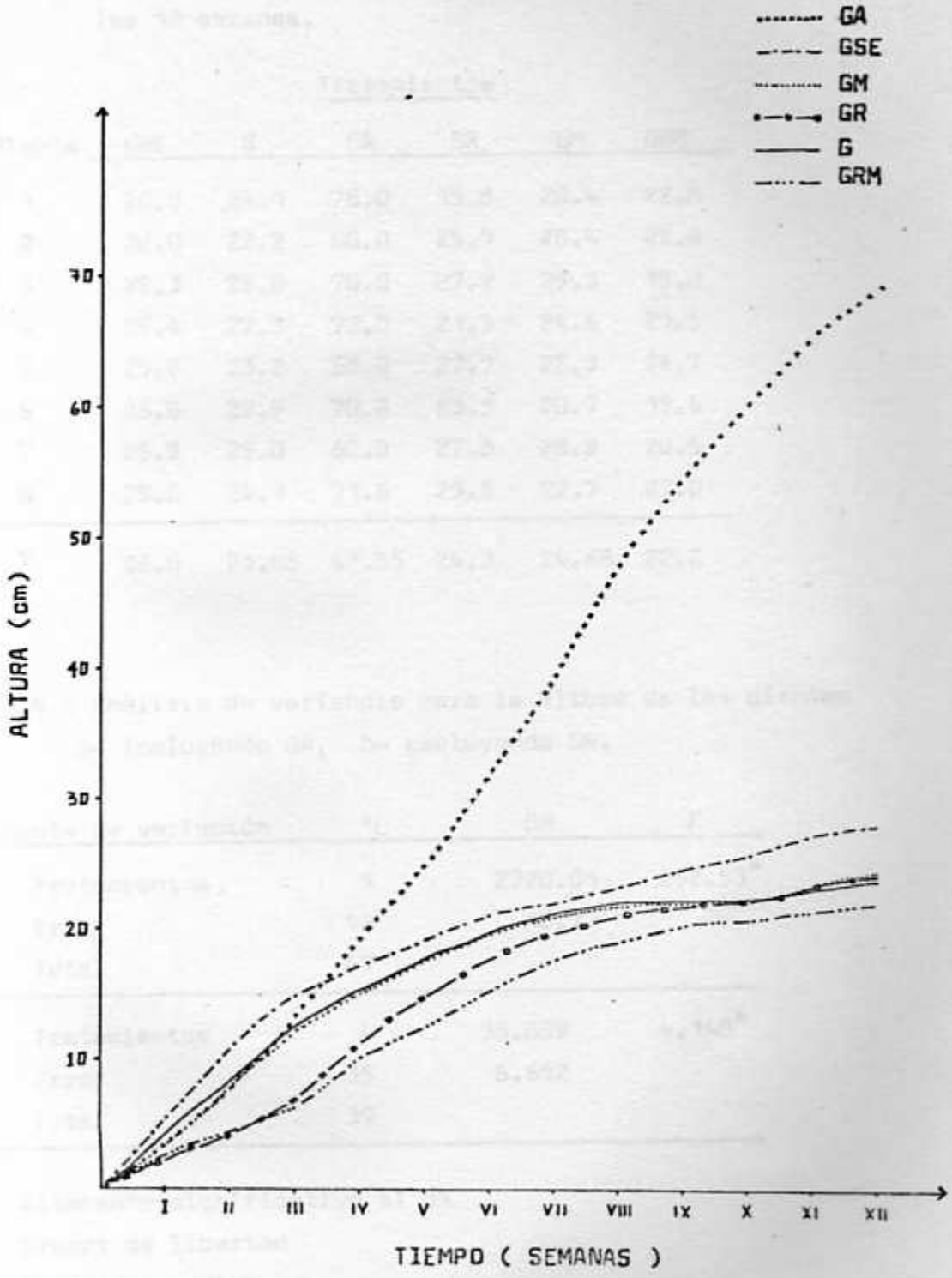


FIGURA 4 : Altura promedio (cm) tomada semanalmente en cada tratamiento.

CUADRO 3 : Altura de las plantas (cm) de cada tratamiento, a las 12 semanas.

	Tratamientos					
Planta	GSE	G	GA	GR	GM	GRM
1	26.0	24.1	76.0	15.8	20.4	22.8
2	28.0	22.2	68.0	25.7	28.4	22.8
3	29.3	22.0	70.0	27.2	29.3	19.0
4	29.4	27.3	72.0	21.5	24.6	21.5
5	25.8	23.2	68.0	27.7	22.3	24.7
6	26.8	22.9	70.8	23.5	20.7	19.6
7	29.9	25.0	60.0	27.8	28.9	20.5
8	29.0	24.1	71.6	25.5	22.7	27.0
$\bar{X}$	28.0	23.85	69.55	24.3	24.66	22.2

CUADRO 4 : Análisis de variancia para la altura de las plantas a- incluyendo GA, b- excluyendo GA.

	Fuente de variación	°L	CM	F
a-	Tratamientos	5	2720.01	252.53*
	Error	42	10.77	
	Total	47		
b-	Tratamientos	4	35.889	4.148*
	Error	35	8.652	
	Total	39		

* Altamente significativo al 1%

°L Grados de libertad

CM Cuadrados medios

CUADRO 5 : Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan) , con respecto a la altura de las plantas . (excluyendo GA).

		GSE	GM	GR	G	GRM
		28.00	24.66	24.30	23.85	22.20
GSE	28.00	0	3.34**	3.70**	4.15**	5.80*
GM	24.66		0	0.36ns	0.81ns	2.46ns
GR	24.30			0	0.45ns	2.10ns
G	23.85				0	1.65ns
GRM	22.20					0

* Diferencia significativa al 1%

** Diferencia significativa al 5%

ns Diferencia no significativa.

CUADRO 6 : Area foliar (cm^2) , en cada tratamiento , a las 12 semanas.

	Tratamientos					
Planta	GSE	G	GA	GR	GM	GRM
1	3.56	2.90	12.54	2.76	2.22	4.15
2	3.35	3.85	12.61	3.15	2.97	3.57
3	3.30	1.78	13.35	3.43	3.31	3.92
4	2.99	2.45	13.47	3.31	2.68	4.60
5	3.26	2.01	11.15	3.45	2.36	4.38
6	3.07	3.17	13.90	3.90	3.53	3.89
7	3.13	2.57	9.33	2.67	3.28	3.01
8	3.23	3.10	13.91	2.84	3.23	3.48
$\bar{X}$	3.24	2.73	12.53	3.19	2.95	3.875

CUADRO 7 : Análisis de variancia para el área foliar en cada tratamiento. a- incluyendo GA, b- excluyendo GA.

	Fuente de variación	°L	CM	F
a-	Tratamientos	5	117.43	192.5*
	Error	42	0.61	
	Total	47		
b-	Tratamientos	4	1.485	6.4847*
	Error	35	0.229	
	Total	39		

* Altamente significativa al 1%

°L Grados de libertad

CM Cuadrados medios

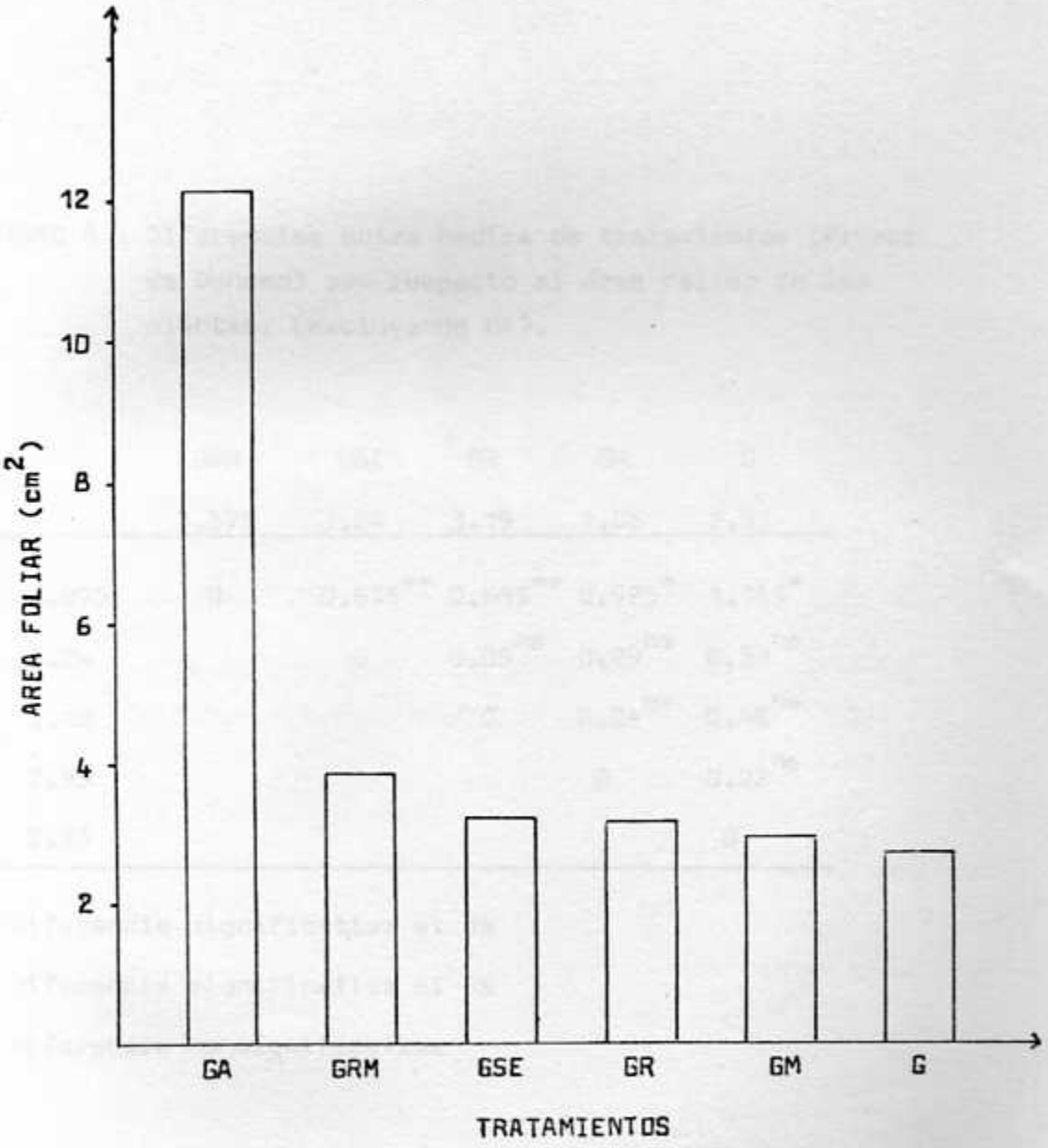


FIGURA 5 : Area foliar promedio (cm^2), a las doce semanas.

CUADRO 8 : Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan) con respecto al área foliar de las plantas. (excluyendo GA).

		GRM	GSE	GR	GM	G
		3.875	3.24	3.19	2.95	2.73
GRM	3.875	0	0.635^{**}	0.685^{**}	0.925^{*}	1.145^{*}
GSE	3.24		0	0.05^{ns}	0.29^{ns}	0.51^{ns}
GR	3.19			0	0.24^{ns}	0.46^{ns}
GM	2.95				0	0.22^{ns}
G	2.73					0

* Diferencia significativa al 1%

** Diferencia significativa al 5%

ns Diferencia no significativa

CUADRO 9 : Peso seco (gramos) de la parte aérea de las plantas, a las 12 semanas.

	Tratamientos					
Planta	GSE	G	GA	GR	GM	GRM
1	0.404	0.271	5.632	0.181	0.210	0.300
2	0.394	0.307	3.584	0.377	0.367	0.299
3	0.451	0.218	3.513	0.369	0.387	0.203
4	0.427	0.374	4.619	0.344	0.306	0.320
5	0.573	0.262	2.947	0.403	0.264	0.370
6	0.534	0.246	3.572	0.344	0.362	0.413
7	0.455	0.311	2.629	0.331	0.392	0.279
8	0.606	0.296	4.434	0.329	0.393	0.386
$\bar{X}$	0.480	0.286	3.866	0.335	0.335	0.320

CUADRO 10 : Análisis de variancia para peso seco de la parte aérea . a- incluyendo GA, b- excluyendo GA .

	Fuente de variación	°L	CM	F
a-	Tratamientos	5	16.5	101.85*
	Error	42	0.162	
	Total	47		
b-	Tratamientos	4	0.045	10.223*
	Error		0.0044	
	Total			

* Significativa al 1%

°L Grados de libertad

CM Cuadrados medios

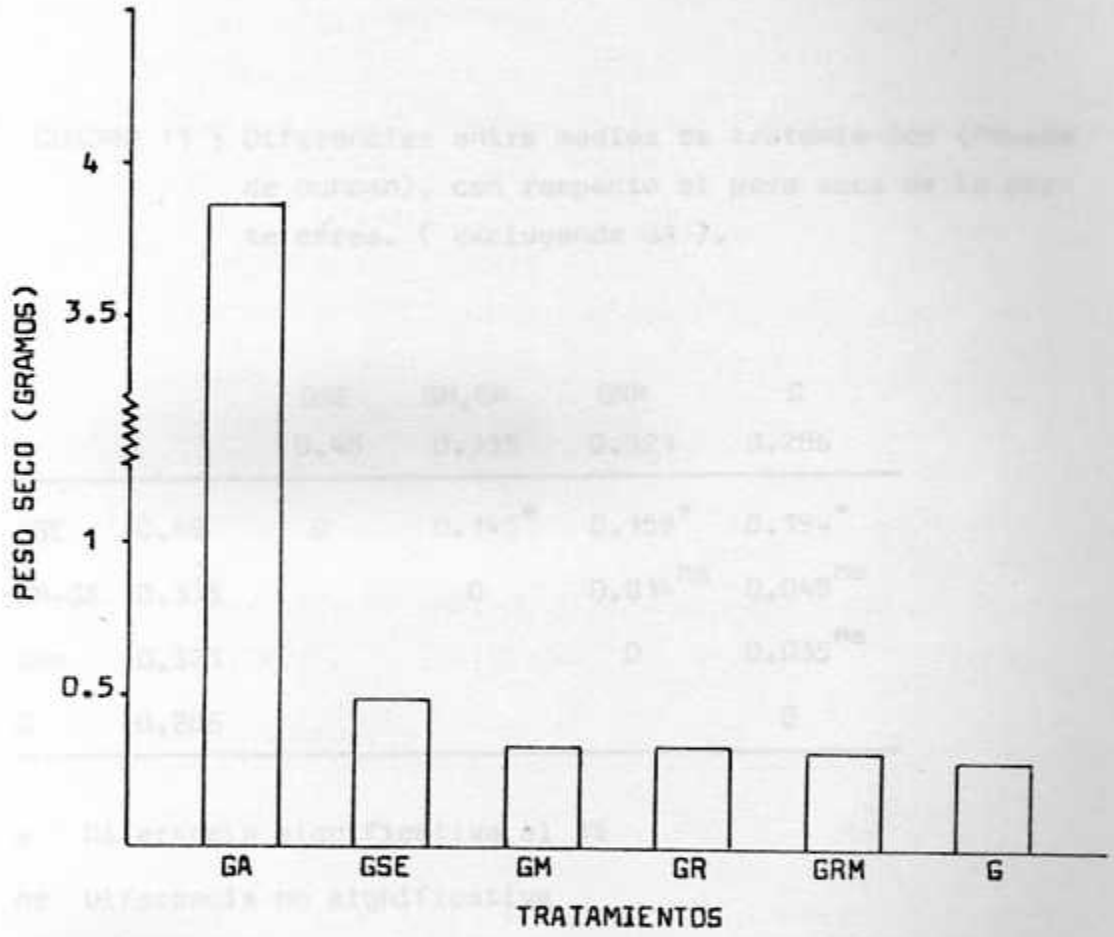


FIGURA 6 : Peso seco promedio (gramos) de la parte aérea, a las doce semanas

CUADRO 11 : Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan), con respecto al peso seco de la parte aérea. (excluyendo GA).

		GSE	GM,GR	GRM	G
		0.48	0.335	0.321	0.286
GSE	0.48	0	0.145*	0.159*	0.194*
GM-GR	0.335		0	0.014ns	0.049ns
GRM	0.321			0	0.035ns
G	0.286				0

* Diferencia significativa al 1%

ns Diferencia no significativa

CUADRO 12 : Peso seco (gramos) del sistema radical, a las 12 semanas.

	Tratamientos					
Planta	GSE	G	GA	GR	GM	GRM
1	0.215	0.125	1.518	0.132	0.220	0.183
2	0.220	0.110	1.314	0.200	0.296	0.209
3	0.212	0.183	1.090	0.312	0.232	0.162
4	0.273	0.135	1.441	0.228	0.217	0.180
5	0.224	0.188	0.999	0.252	0.216	0.213
6	0.223	0.142	1.176	0.197	0.133	0.159
7	0.212	0.145	0.989	0.224	0.261	0.181
8	0.220	0.168	0.893	0.216	0.179	0.279
$\bar{X}$	0.225	0.150	1.180	0.220	0.220	0.196

CUADRO 13 : Análisis de variancia para el peso seco del sistema radical. a- incluyendo GA, b- excluyendo GA .

	Fuente de variación	°L	CM	F
a-	Tratamientos	5	1.274	127.4*
	Error	42	0.01	
	Total	47		
b-	Tratamientos	4	0.0075	4.54*
	Error	35	0.00165	
	Total	39		

* Altamente significativa al 1%

°L Grados de libertad

CM Cuadrados medios

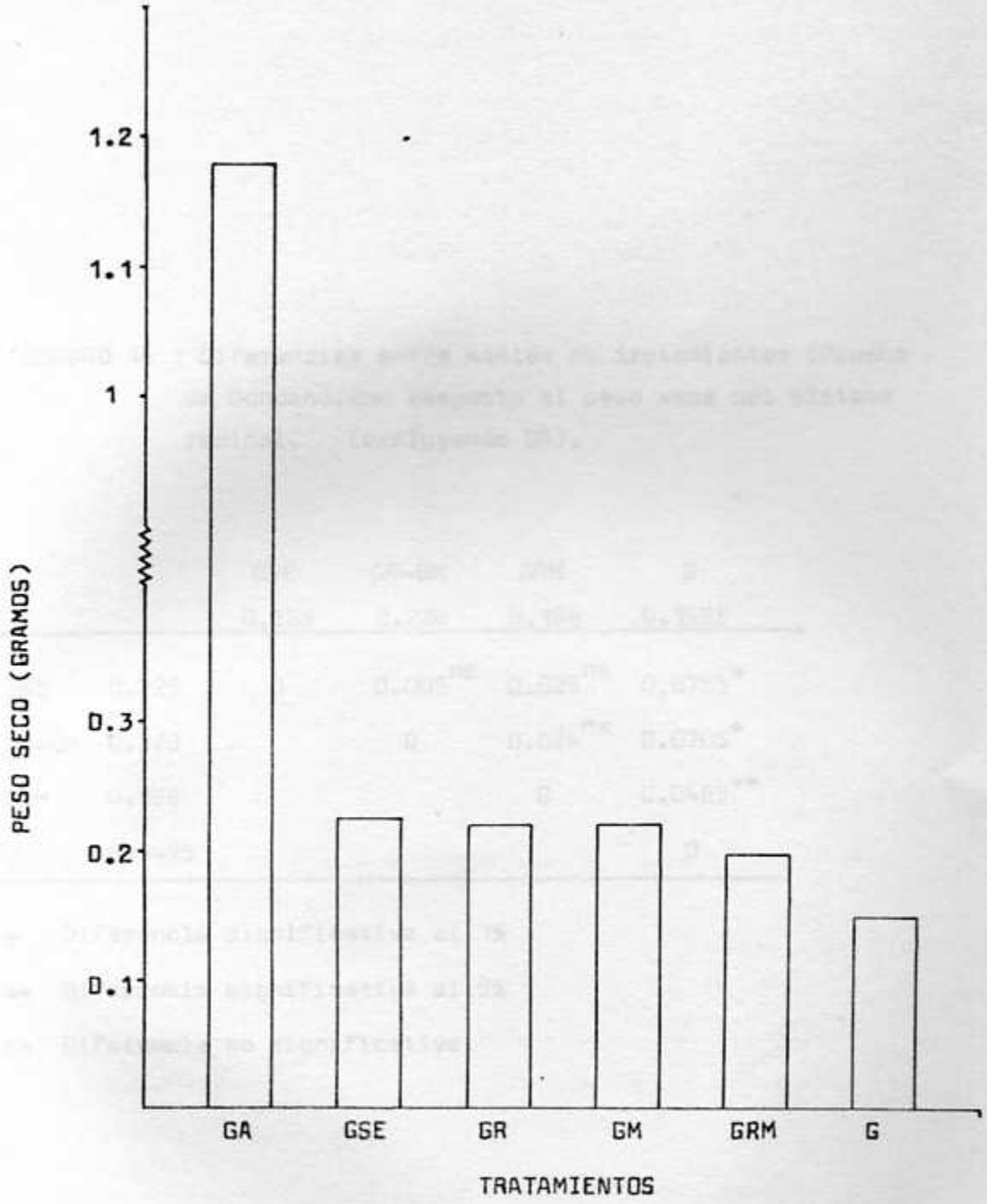


FIGURA 7 : Peso seco promedio (gramos) de la raíz, a las doce semanas.

CUADRO 14 : Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan),con respecto al peso seco del sistema radical. (excluyendo GA).

		GSE	GR-GM	GRM	G
		0.225	0.220	0.196	0.1495
GSE	0.225	0	0.005^{ns}	0.029^{ns}	$0,0755^{*}$
GR-GM	0.220		0	0.024^{ns}	0.0705^{*}
GRM	0.196			0	0.0465^{**}
G	0.1495				0

* Diferencia significativa al 1%

** Diferencia significativa al 5%

ns Diferencia no significativa.

CUADRO 15 : Número de nódulos por planta, a las 12 semanas

	Tratamientos					
Planta	GSE	G	GA	GR	GM	GRM
1	31	7	64	23	10	22
2	29	18	50	32	06	21
3	20	12	36	36	13	20
4	36	04	70	20	11	31
5	52	20	56	38	08	35
6	23	12	38	20	05	19
7	72	08	40	55	22	17
8	47	19	19	22	06	21
$\bar{X}$	39	12	47	31	10	23

CUADRO 16 : Análisis de variancia para el número de nódulos.
(incluye GA).

Fuente de variación	°L	CM	F
Tratamientos	5	1674.15	12.05*
Error	42	138.93	
Total	47		

* Significativa al 1%

°L Grados de libertad

CM Cuadrados medios

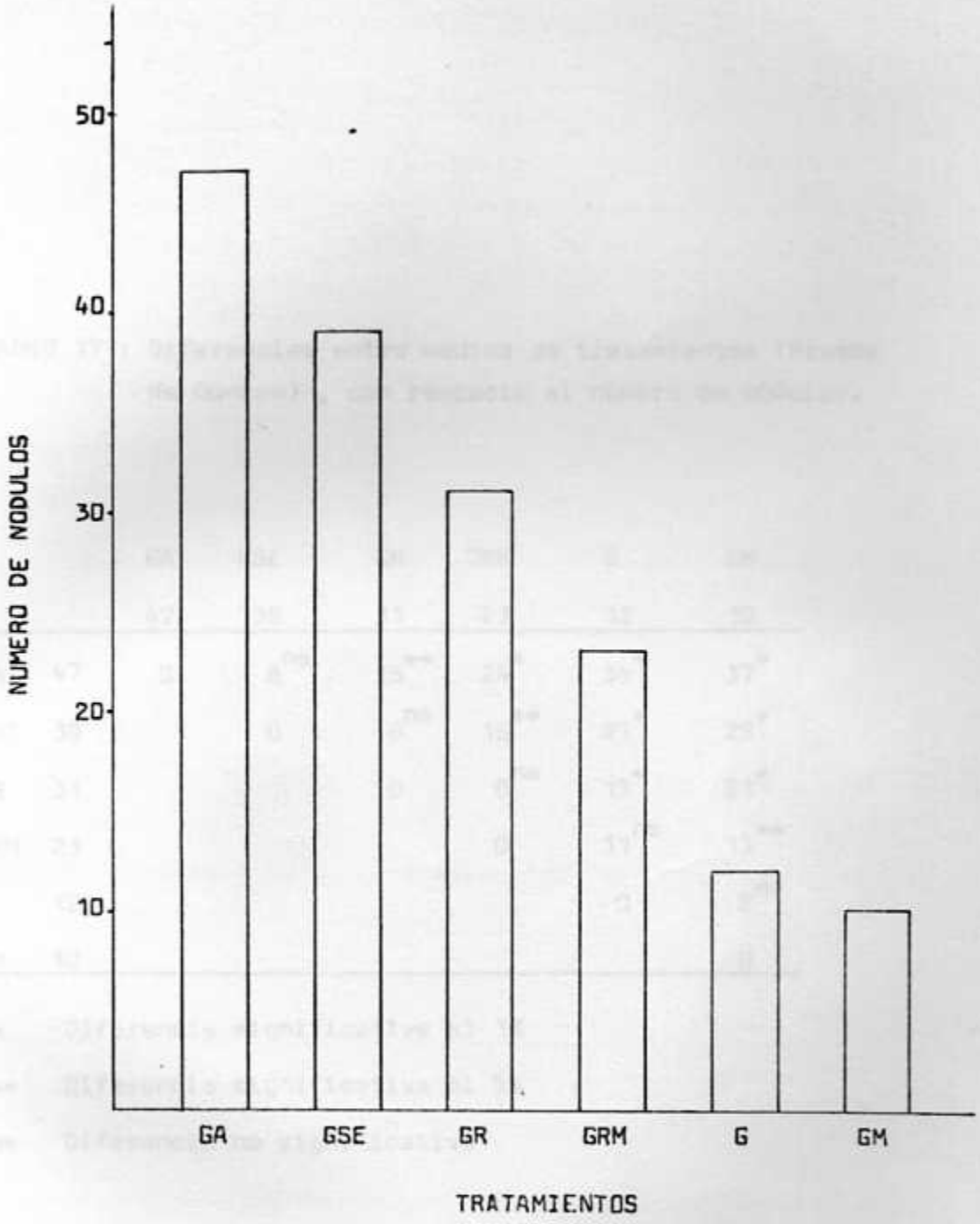


FIGURA 8 : Número de nódulos promedio por planta a las doce semanas.

CUADRO 17 : Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan) , con respecto al número de nódulos.

		GA	GSE	GR	GRM	G	GM
		47	39	31	23	12	10
GA	47	0	8^{ns}	16**	24*	35*	37*
GSE	39		0	8^{ns}	16**	27*	29*
GR	31			0	8^{ns}	19*	21*
GRM	23				0	11^{ns}	13**
G	12					0	2^{ns}
GM	10						0

* Diferencia significativa al 1%

** Diferencia significativa al 5%

ns Diferencia no significativa

CUADRO 18 : Peso seco (miligramos) de los nódulos, a las 12 semanas.

Planta	GSE	G	GA	GR	GM	GRM
1	22.0	1.0	40.0	8.0	4.0	6.0
2	20.0	4.0	25.0	9.0	3.0	12.0
3	17.0	2.0	15.0	12.0	2.5	8.0
4	19.0	2.0	34.0	8.0	4.0	6.0
5	26.0	4.0	21.0	12.0	3.0	12.0
6	14.0	1.0	16.0	6.0	1.0	5.0
7	32.0	1.0	17.0	22.0	8.0	5.0
8	31.0	4.0	26.0	6.0	1.0	15.0
$\bar{X}$	22.6	2.4	24.25	10.4	3.3	8.6

CUADRO 19 : Análisis de variancia para el peso seco de los nódulos. (incluyendo GA).

Fuente de variación	°L	CM	F
Tratamientos	5	712.11	24.85*
Error	42	28.65	
Total	47		

* Significativa al 1%

°L Grados de libertad

CM Cuadrados medios

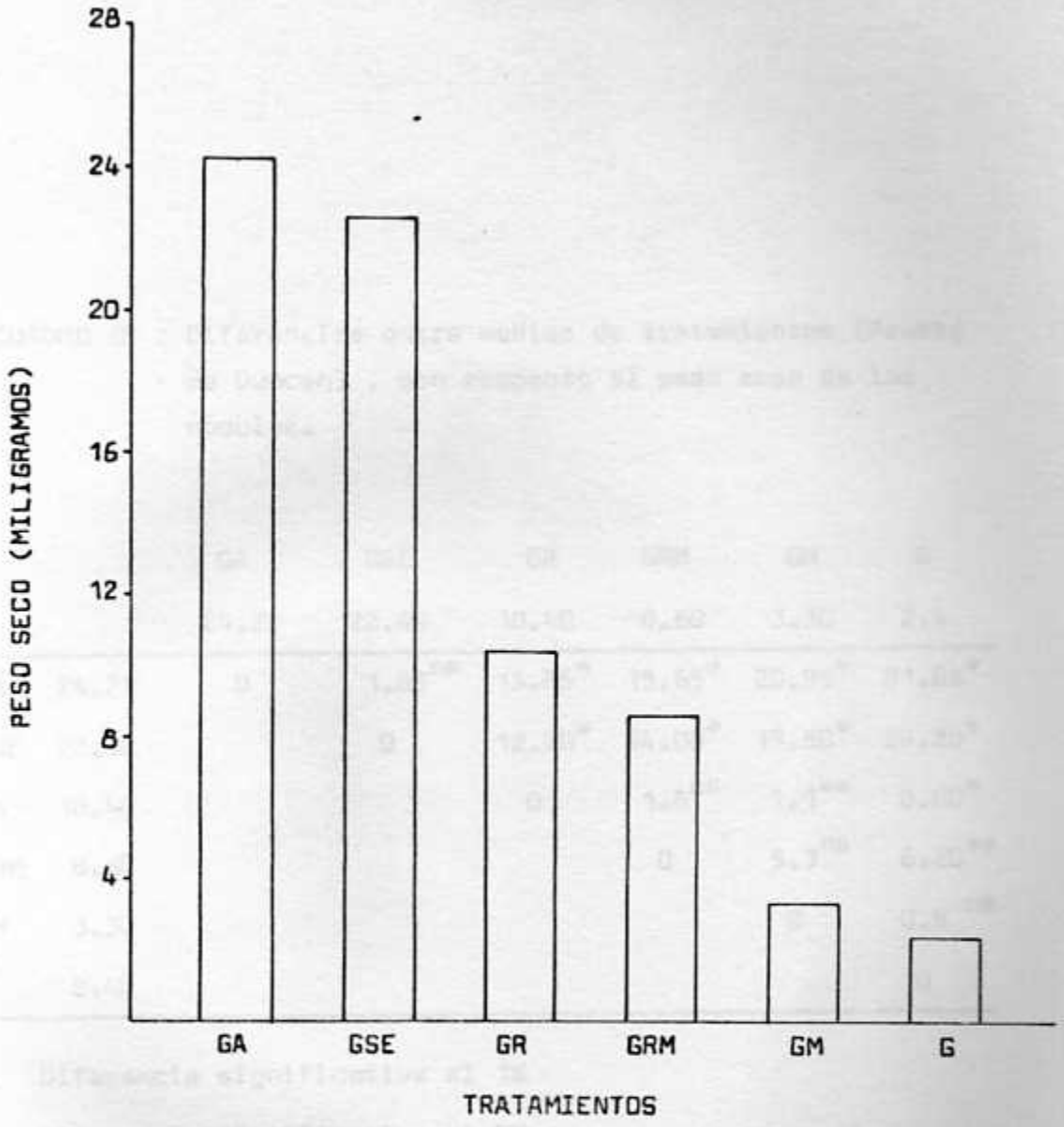


FIGURA 9 : Peso seco promedio (miligramos) de los nódulos, a las doce semanas.

CUADRO 20 : Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan) , con respecto al peso seco de los nódulos.

		GA	GSE	GR	GRM	GM	G
		24.25	22.60	10.40	8.60	3.30	2.4
GA	24.25	0	1.65^{ns}	13.85^{*}	15.65^{*}	20.95^{*}	21.85^{*}
GSE	22.60		0	12.20^{*}	14.00^{*}	19.50^{*}	20.20^{*}
GR	10.40			0	1.8^{ns}	7.1^{**}	8.00^{*}
GRM	8.60				0	5.3^{ns}	6.20^{**}
GM	3.30					0	0.9^{ns}
G	2.40						0

* Diferencia significativa al 1%

** Diferencia significativa al 5%

ns . Diferencia no significativa

CUADRO 21 : Nitrógeno total mg/planta, a las 12 semanas.

Planta	GSE	G	GA	GR	GM	GRM
1	7.474	8.935	142.926	6.534	7.56	10.320
2	8.944	10.710	102.860	13.383	11.67	9.598
3	7.847	8.260	96.890	12.214	12.38	6.496
4	7.600	12.903	122.400	9.980	10.25	10.464
5	9.630	9.250	85.170	14.310	10.35	12.358
6	7.260	9.373	107.160	12.560	11.40	15.074
7	7.870	9.670	68.100	10.195	10.74	9.625
8	9.820	8.970	101.54	12.300	12.57	13.376
$\bar{X}$	8.3	9.76	103.4	11.43	10.86	10.91

CUADRO 22 : Análisis de variancia para el nitrógeno total (mg/planta), a- incluyendo GA, b- excluyendo GA .

	Fuente de variación	°L	CM	F
a-	Tratamientos	5	11573.04	131.62*
	Error	42	87,93	
	Total	47		
b-	Tratamientos	4	12.4845	3.336**
	Error	35	3.7417	
	Total	39		

* Significativa al 1%

** Significativa al 5%

°L Grados de libertad

CM Cuadrados medios

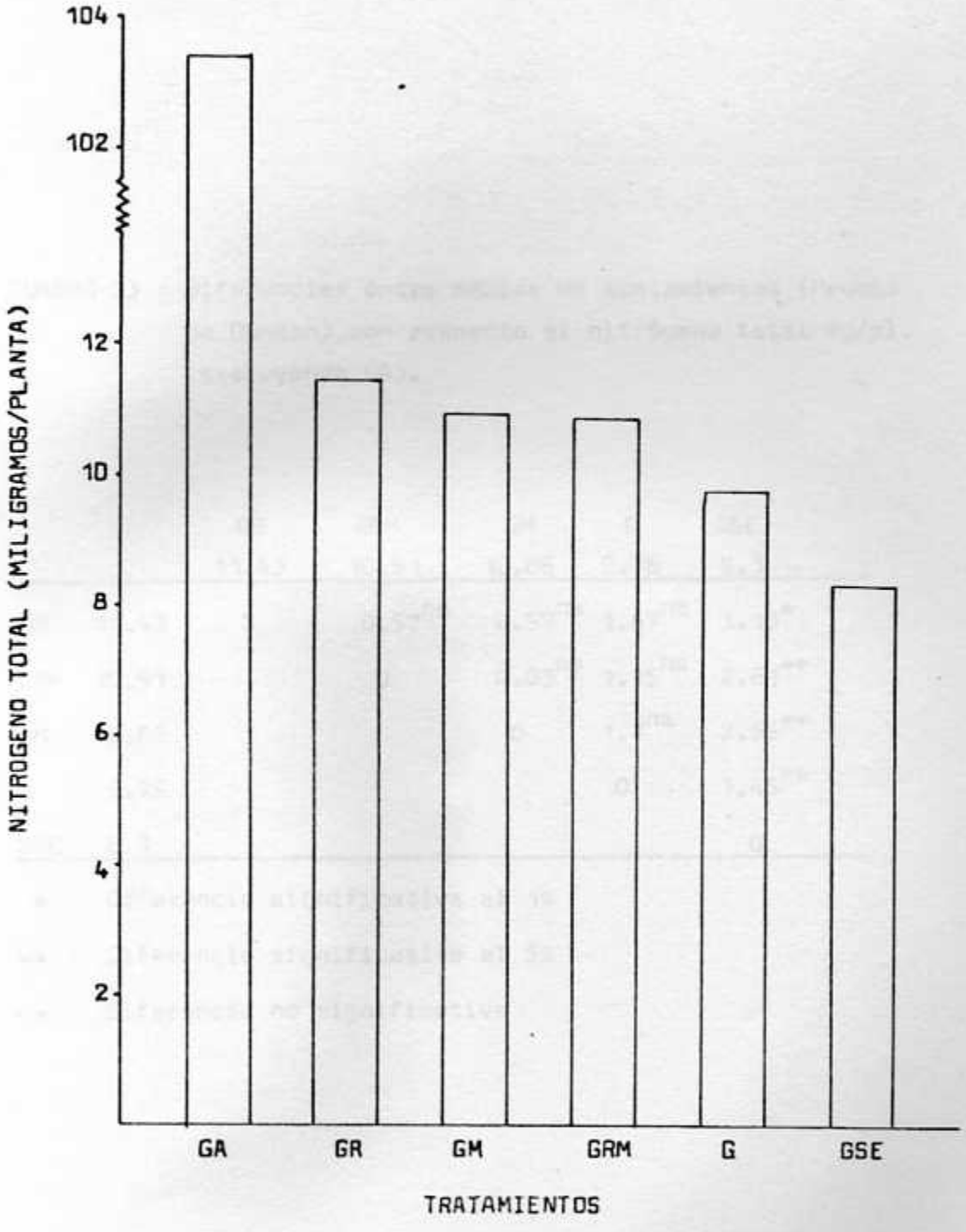


FIGURA 10 : Nitrógeno total (mg/planta), a las doce semanas

CUADRO 23 : Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan),con respecto al nitrógeno total mg/pl. (excluyendo GA).

		GR	GRM	GM	G	GSE
		11.43	10.91	10.86	9.76	8.3
GR	11.43	0	0.52^{ns}	0.57^{ns}	1.67^{ns}	3.13^{*}
GRM	10.91		0	0.05^{ns}	1.15^{ns}	2.61^{**}
GM	10.86			0	1.1^{ns}	2.56^{**}
G	9.76				0	1.46^{ns}
GSE	8.3					0

* Diferencia significativa al 1%

** Diferencia significativa al 5%

ns Diferencia no significativa

CUADRO 24 : Fósforo total mg/planta, a las 12 semanas.

	Tratamientos					
Planta	GSE	G	GA	GR	GM	GRM
1	0.180	0.1355	2.77	0.172	0.294	0.185
2	0.320	0.187	2.50	0.200	0.292	0.248
3	0.364	0.148	3.100	0.165	0.290	0.167
$\bar{X}$	0.29	0.157	2.79	0.179	0.292	0.2

CUADRO 25 : Análisis de variancia para el fósforo total mg/planta. a- incluyendo GA , b- excluyendo GA.

	Fuente de variación	°L	CM	F
a-	Tratamientos	5	3.304	197.84*
	Error	12	0.0167	
	Total	17		
b-	Tratamientos	4	0.011875	4.8469**
	Error	10	0.00245	
	Total	14		

* Significativo al 1%

** Significativo al 5%

°L Grados de libertad

CM Cuadrados medios

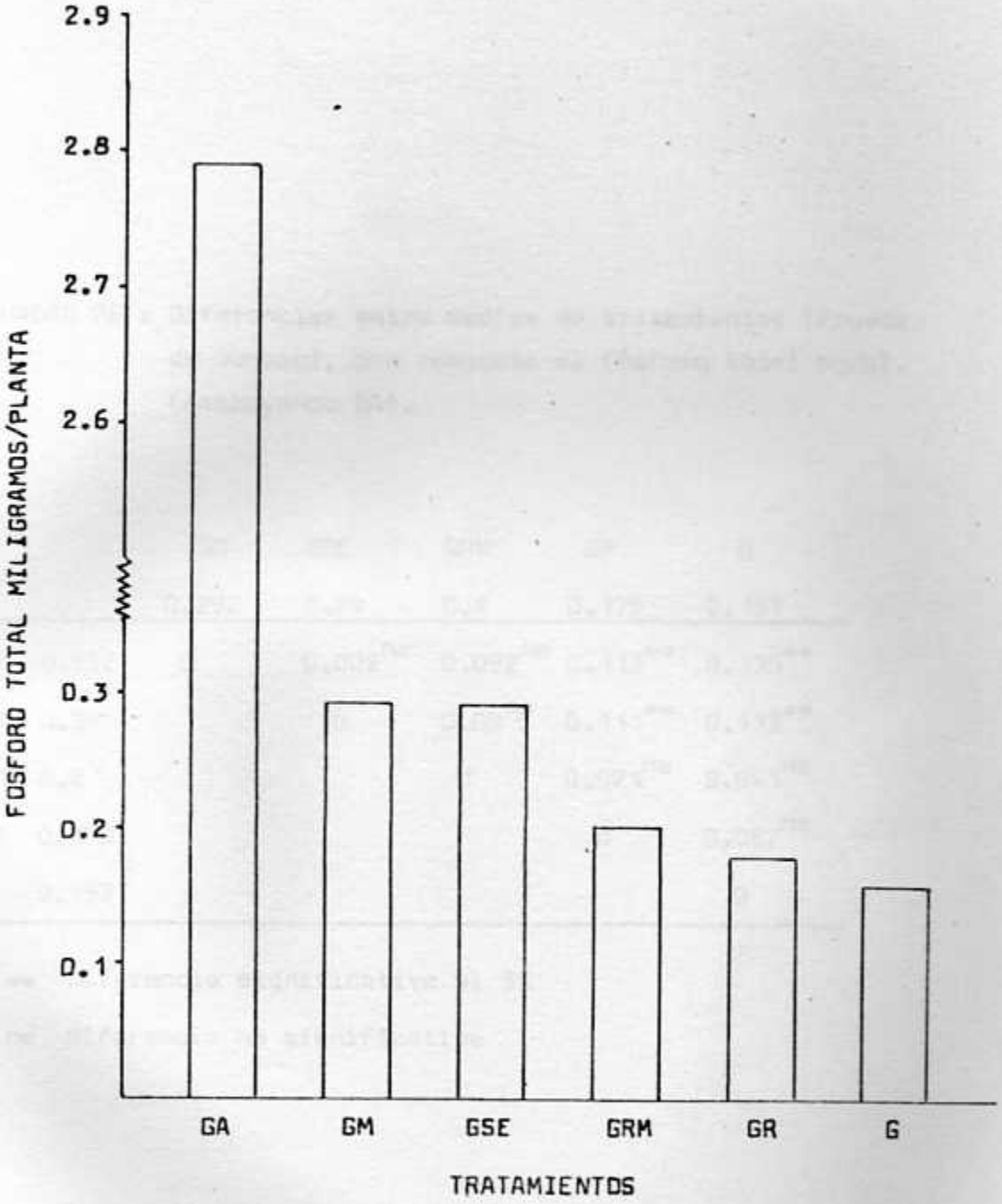


FIGURA 11 : Fósforo total (mg/planta), a las doce semanas.

CUADRO 26 : Diferencias entre medias de tratamientos (Prueba de Duncan), con respecto al fósforo total mg/pl. (excluyendo GA).

		GM	GSE	GRM	GR	G
		0.292	0.29	0.2	0.179	0.157
GM	0.292	0	0.002^{ns}	0.092^{ns}	0.113^{**}	0.135^{**}
GSE	0.29		0	0.09^{ns}	0.111^{**}	0.133^{**}
GRM	0.2			0	0.021^{ns}	0.043^{ns}
GR	0.179				0	0.022^{ns}
G	0.157					0

** Diferencia significativa al 5%

ns Diferencia no significativa

CUADRO 27 : Datos evaluados en tres plantas que permanecieron durante quince días más en el invernadero.

	Variables evaluadas				
Planta	Altura (cm)	Peso seco foliar(g)	Número de nódulos	Nitrógeno tot.mg/pl	Fósforo tot. mg/planta
GM_5	50.5	1.93	8	6.12	1.74
GM_{14}	39.0	1.60	12	4.80	1.44
GSE_9	47.3	1.85	35	3.83	1.48