

# INTERACCIÓN *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV *TRIFOLII* Y HONGOS MICORRÍZICOS EN UN ANDISOL CON DIFERENTES NIVELES DE SATURACIÓN DE ALUMINIO

## *INTERACTION OF RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV TRIFOLII AND MYCORRHIZAL FUNGI IN AN ANDISOL AT DIFFERENT LEVELS OF ALUMINIUM SATURATION*

Claudia G. Castillo R.<sup>1\*</sup>; Rosa Rubio H.<sup>2</sup>; Horacio Urzúa S.<sup>3</sup>; Fernando Borie B.<sup>2</sup>

### RESUMEN

La fitotoxicidad por Al es una seria limitante de la productividad de praderas crecidas sobre suelos volcánicos afectando la nodulación y efectividad de los *Rhizobium*. El objetivo del estudio consistió en seleccionar cepas de *Rhizobium* de colección para estudiar su efectividad en *Trifolium repens* crecido en un Andisol con cepas nativas y distinta saturación de Al. Para ello se evaluó previamente en caldo nutritivo la tolerancia a la acidez y toxicidad por Al de 12 cepas de colección mediante control de curvas de crecimiento. Paralelamente, se inocularon los *Rhizobium* en un Andisol para evaluar su efectividad mediante rendimiento de *Trifolium pratense*. Se seleccionaron las cepas R-109, R-113 y R-115 para inocularlas en el Andisol utilizando cuatro tratamientos: suelo adicionado de 2 Mg CaCO<sub>3</sub> ha<sup>-1</sup> (SAI<sub>1</sub>), un testigo (SAI<sub>2</sub>) y suelo adicionado de dos niveles de saturación Al (SAI<sub>1</sub>, SAI<sub>4</sub>) utilizando *Trifolium repens* como hospedero. Las plantas mostraron capacidad para asociarse con las especies inoculadas presentando mayor efectividad R-113-SAI<sub>1</sub> sinergismo positivo expresado en variables microbiológicas como nodulación (16 nódulos maceta<sup>-1</sup>), esporas de hongos micorrízicos arbusculares, HMA (384 esporas 100g<sup>-1</sup>), colonización HMA (45%) junto con variables agronómicas alcanzándose un incremento de biomasa foliar (93,5%) frente al testigo. Niveles más elevados de Al afectaron la inoculación con cepas de colección; así, con R-109 se obtuvo el menor crecimiento radical y nodulación respecto al suelo natural mientras que R-113 fue la cepa más efectiva.

**Palabras clave:** Micorriza arbuscular, actividad fosfatásica, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*.

### ABSTRACT

Aluminium phytotoxicity is a serious limitation of the productivity of prairies growing on volcanic soil by affecting nodulation and effectiveness of *Rhizobium*. The aim of this study was to select *Rhizobium* strains to determine the effect as inoculant on *Trifolium repens* cropped in an Andisol with different aluminium saturation levels. Acidity tolerance (pH 4.5 and 6.0) of twelve *Rhizobium* strains of collection at three Al levels (100, 200, 300 µM) was evaluated in mineral nutritive medium *in vitro*. Simultaneously, in a greenhouse trial, strains effectiveness were tested by inoculation of *Trifolium pratense* growing in an acidic Andisol and compared with dry matter accumulation produced by native strains. According to the results of this two trials, three *Rhizobium* strains (R-109, R-113 and R-115) were selected to study the effect of their inoculation on *Trifolium repens* growth cropped in an Andisol at four Al saturation levels (SAI<sub>1</sub> to SAI<sub>4</sub>). In addition, the effect on arbuscular mycorrhizal propagules was also studied. Plants showed different capacity for association with the inoculated strains giving the best response R-113 at SAI<sub>1</sub> level with positive synergism expressed by microbiological parameters such as high nodulation (16 nodules pot<sup>-1</sup>), AMF spore number (384 spores 100 g<sup>-1</sup>), root colonization percentage (45%), together with agronomical variables with an increase of aerial phytomass (93,5%) in comparison with the control. Higher Al levels had an deleterious effect on the inoculation of collection strains; therefore, with R-109 strain inoculation the smallest root growth and nodulation were observed in comparison with soil with native strains whereas R-113 was the more effective one.

**Key words:** Arbuscular mycorrhizae, phosphatase activity, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*.

<sup>1</sup> Universidad Católica de Temuco, Casilla 15-D, Temuco, Chile.

<sup>2</sup> Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.

<sup>3</sup> Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 306 Correo 22, Santiago, Chile. E-mail: ccastill@uct.cl

## INTRODUCCIÓN

La Novena y Décima Región del sur de Chile corresponden a zonas ganaderas por excelencia, siendo las praderas la base de la alimentación con una superficie aproximada de 2,5 millones de ha (Campillo, 1997), de las cuales la pradera mixta compuesta por trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y ballica perenne (*Lolium perenne* L.) ocupa una superficie de 1,29 millones de ha (VI Censo Nacional Agropecuario, 1997). En dicha área existen amplias extensiones de suelos ácidos (Mora *et al.*, 2006) originados por las abundantes lluvias de los meses de invierno con lixiviación de cationes y por el uso de fertilizantes ácidos del tipo amoniacal (Mora y Demanet, 1999). En este tipo de suelos el P es adsorbido fuertemente sobre los hidróxidos de Fe y Al, lo que incide en un incremento de la toxicidad por Al (Fageria y Stone, 2006), con un consiguiente descenso en la productividad y calidad de las praderas (Mora *et al.*, 2004) como también de la actividad microbiana (Yang *et al.*, 2004).

En la endorriósfera (Fageria y Stone, 2006) existe una amplia gama de microorganismos que favorecen la nutrición vegetal y, por tanto, el funcionamiento de toda la biosfera. Entre ellos se encuentran los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), simbioses que mejoran la captación de nutrientes poco móviles desde el suelo (Azcón *et al.*, 1991) y los *Rhizobium* que forman asociaciones simbióticas con las raíces de leguminosas multiplicándose dentro de las células corticales con formación de nódulos (Helyar, 2003). La eficiencia de ambas simbiosis dependerá del hongo o bacteria, hospedero y condiciones edáficas como acidez, toxicidad por Al (Hungria y Vargas, 2000), niveles de nutrientes, metales pesados, temperatura y humedad (Campo y Wood, 2001).

De esta manera, la actividad microbiológica aumenta la disponibilidad de nutrientes, resultando ser procesos económicamente más asequibles que los agroquímicos y que permiten la conservación del medio ambiente (Stamford *et al.*, 1998). Sin embargo, por la gran diversidad de poblaciones de *Rhizobium* nativas se requieren cepas adaptadas a las condiciones de acidez y toxicidad de Al (De-Polli *et al.*, 1988) que sean capaces de sobrevivir en estos suelos ácidos y que posibiliten la formación de una simbiosis efectiva (Taylor *et al.*, 1991).

De aquí que el objetivo de este estudio consistió en seleccionar cepas de *Rhizobium* de colección

tolerantes a la acidez y Al en caldo nutritivo. Paralelamente mediante inoculación en un suelo ácido se estudió su efectividad en *Trifolium pratense* para, finalmente, estudiar en un Andisol con distintos niveles de saturación de Al el efecto de la inoculación de las cepas seleccionadas sobre *Trifolium repens* mediante evaluación de parámetros edáficos, microbiológicos del microsimbionte y de rendimiento del macrobionte.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en los Laboratorios e Invernaderos del Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad de La Frontera.

### Ensayo I: selección de cepas tolerantes a acidez y toxicidad por Al en caldo nutritivo

Para cuantificar el número de células microbianas en un cultivo existen métodos directos o indirectos; entre los indirectos uno de los más utilizados es la medición de turbidez, metodología relativamente rápida basada en la capacidad que tienen las células microbianas de dispersar la luz que incide sobre ellas y como el tamaño de las células en una población es prácticamente constante, el grado de dispersión se considera proporcional a la concentración de células presentes (Aquiahuati y Pérez, 2004).

Para este ensayo se utilizaron doce cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* de colección (R 100, 109, 110, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 y 121) proporcionadas por PROBICAL Ltda., reproducidas previamente mediante siembra estéril en placa petri con agar nutritivo-extracto de levadura-manitol (Cleyet-Marel, 1983) bajo condiciones estériles en cámara de flujo laminar. La duración aproximada del ensayo fue de dos meses, utilizándose tubos de tapa rosca (18 x 2,5 cm) conteniendo 35 mL de caldo nutritivo de extracto levadura-manitol (Cleyet-Marel, 1983), exento de agar, ajustado a dos niveles de pH (4,5 y 6,0) y adicionado de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  en dosis equivalente a 100 ( $Al_1$ ), 200 ( $Al_2$ ) y 300 ( $Al_3$ )  $\mu M$  de Al, con tres repeticiones por tratamiento. El diseño experimental fue uno completamente al azar que incluyó como tratamientos las doce cepas de *Rhizobium*, los cuatro niveles de Al incluyendo un control sin Al ( $Al_0$ ), dos niveles de pH y tres repeticiones, con un total de 288 unidades experimentales. Los tubos sembrados con cada una de las cepas de

colección se mantuvieron en oscuridad a 26 °C con agitación y observación permanente de aparición de turbidez, la que se inició el día 4. Mediante lecturas adecuadas para un espectrofotómetro, se evaluó diariamente la concentración celular desde el día 4 hasta el día 7 (T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>7</sub>), tiempo en que las cepas dejaron de reproducirse.

### **Ensayo II: selección de cepas eficientes de *Rhizobium* en *Trifolium pratense* crecido en un Andisol serie Gorbea**

Este ensayo en invernadero se realizó en paralelo con el ensayo en caldo nutritivo y como en los suelos ácidos las leguminosas forrajeras presentan distintos grados de sensibilidad a toxicidad por Al, se utilizó como planta hospedera *Trifolium pratense* por ser una especie sensible (Barrientos *et al.*, 1994).

*Suelo.* Se utilizó un Andisol serie Gorbea (39°07'72"41') de textura franco limosa a franca en sus primeras estratas, muestreado a 20 cm de profundidad procedente de un cultivo de lupino.

*Reproducción de los Rhizobium.* Las doce cepas de colección conservadas a 4 °C en agar inclinado se inocularon en matraces Erlenmeyer estériles conteniendo caldo extracto de levadura-manitol (Cleyet-Marel, 1983) exento de agar, agitándose en oscuridad durante 5 días a 26 °C para aumentar la masa celular.

*Diseño experimental.* Se utilizó un diseño completamente al azar que incluyó las doce cepas de colección más un testigo correspondiente al suelo conteniendo las cepas nativas y cuatro repeticiones, con un total de 52 unidades experimentales.

*Siembra.* Macetas de aproximadamente 300 g de capacidad se completaron con el Andisol tamizado a 2 mm y fertilizado con superfosfato triple (SFT) con el equivalente a 180 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, sembrándose ocho semillas pregerminadas de *Trifolium pratense* cv Quiñequeli. A los siete días después de la siembra (DDS) se añadieron 2 mL de suspensión de *Rhizobium* por maceta, manteniéndose durante todo el ensayo la humedad del suelo a capacidad de campo. A la semana siguiente, se ralearon las macetas para dejar una densidad de tres plantas maceta<sup>-1</sup>. Durante el transcurso del ensayo se realizaron dos cortes mensuales de la parte aérea, realizándose la cosecha a los 160 días después de la emergencia (DDE), determinándose la cantidad de materia seca maceta<sup>-1</sup> mediante secado en estufa a 65 °C por 48 h.

*Selección de tres cepas de colección.* De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de exposición de las cepas al caldo nutritivo con distintos niveles de Al y el de inoculación de las cepas en el suelo con trébol rosado, se seleccionaron los *Rhizobium* R-109, R-113 y R-115 como los más efectivos y tolerantes a Al.

### **Ensayo III: eficiencia de inoculación de tres cepas de *Rhizobium* de colección en un Andisol con distintos niveles de saturación de Al sobre *Trifolium repens***

Con las tres cepas seleccionadas se procedió a evaluar la respuesta de su inoculación en el Andisol serie Gorbea conteniendo los microorganismos nativos (entre ellos *Rhizobium* y HMA) sobre *T. repens* en un ensayo en invernadero que permaneció durante siete meses bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, luminosidad y que incluyó cuatro tratamientos:

- SAL<sub>1</sub>: Andisol adicionado de CaCO<sub>3</sub> en una dosis equivalente a dos Mg de cal ha<sup>-1</sup>.
- SAL<sub>2</sub>: Andisol serie Gorbea.
- SAL<sub>3</sub>: Andisol seco adicionado de una solución de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·18H<sub>2</sub>O en el equivalente a 2 cmol (+) kg<sup>-1</sup> de Al.
- SAL<sub>4</sub>: El mismo Andisol utilizado en el tratamiento anterior pero con una dosis equivalente a 3,5 cmol (+) kg<sup>-1</sup> de Al (Mora y Barrow, 1996).

El análisis químico de los suelos al comienzo del ensayo se muestra en el Cuadro 1. Todos los tratamientos fueron fertilizados por una vez con SFT con el equivalente a 180 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> utilizándose como hospedero trébol blanco (*Trifolium repens* cv Huia), leguminosa utilizada comúnmente en praderas mixtas de la IX y X Región. Las macetas de aproximadamente 700 g de capacidad se completaron con el suelo de cada tratamiento, sembrándose 20 semillas pregerminadas y manteniéndose durante todo el ensayo la humedad del suelo a capacidad de campo. A los siete DDS se añadieron a cada maceta 2 mL de suspensión de *Rhizobium*, repitiéndose la aplicación nuevamente a la semana siguiente. A los 15 DDS se raleó el ensayo, dejando una densidad de 15 plantas maceta<sup>-1</sup>. El diseño experimental fue completamente al azar, teniendo como tratamientos las cuatro cepas de *Rhizobium* (incluyendo un control sólo con cepas nativas), los cuatro niveles de saturación de Al y cuatro repeticiones con un

Cuadro 1

Características químicas del Andisol serie Gorbea con distintos niveles de saturación de Al en un comienzo y a la finalización del ensayo de inoculación con tres cepas de *Rhizobium* de colección sobre *Trifolium repens*.

Suelo Andisol	Dosis	Cepa	P (mg kg <sup>-1</sup> )	pH	Ca	Mg	K	Al	Bases	CICE	Al Sat. (%)
					(cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )						
Inicial	SAI <sub>1</sub>	T <sub>0</sub>	21	5,49	3,59	0,24	0,33	0,03	4,41	4,44	0,68
Final		T <sub>0</sub>	15	5,18	4,64	1,15	0,32	0,06	6,77	6,83	0,9
		R-109	18	5,18	4,47	0,98	0,36	0,08	6,48	6,56	1,2
		R-113	16	5,40	4,15	0,82	0,28	0,05	5,83	5,88	0,9
		R-115	18	5,36	4,30	0,86	0,15	0,05	5,95	6,00	0,8
Inicial	SAI <sub>2</sub>	T <sub>0</sub>	20	4,86	1,05	0,23	0,35	0,22	1,92	2,14	10,28
Final		T <sub>0</sub>	16	4,90	2,59	1,21	0,34	0,22	4,76	4,98	4,4
		R-109	16	4,90	2,29	1,00	0,31	0,27	4,29	4,56	5,9
		R-113	18	4,90	1,88	0,71	0,26	0,28	3,44	3,72	7,5
		R-115	18	5,04	2,50	1,01	0,25	0,21	4,34	4,55	4,6
Inicial	SAI <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	19	5,03	1,27	0,24	0,30	0,42	1,99	2,41	17,43
Final		T <sub>0</sub>	19	4,86	2,96	1,27	0,34	0,32	5,23	5,55	5,8
		R-109	15	4,99	2,48	1,10	0,30	0,33	4,54	4,87	6,8
		R-113	16	4,85	2,45	0,91	0,29	0,49	4,26	4,75	10,3
		R-115	15	4,87	2,34	0,92	0,27	0,39	4,08	4,47	8,7
Inicial	SAI <sub>4</sub>	T <sub>0</sub>	16	4,79	1,24	0,25	0,31	0,59	2,08	2,67	22,10
Final		T <sub>0</sub>	15	5,02	2,39	1,16	0,33	0,38	4,46	4,84	7,9
		R-109	16	4,87	2,39	1,12	0,29	0,40	4,43	4,83	8,3
		R-113	16	4,86	2,12	0,76	0,26	0,59	3,72	4,31	13,7
		R-115	15	5,03	2,51	1,07	0,42	0,40	4,66	5,06	7,9

total de 128 unidades experimentales. Para cada parámetro evaluado se realizó un análisis ANOVA de una vía con cuatro repeticiones, aplicándose la transformación arcoseno previo al análisis de varianza cuando fue necesario para normalización de datos, seguido por el Test de Duncan de rango múltiple (Duncan, 1955) ( $\alpha \leq 0,05$ ) mediante el programa estadístico JMP 5.01 (SAS).

### Evaluaciones

*Hospedero.* Al término del ensayo se determinó el rendimiento acumulado de la planta a través de cuatro cortes mensuales, utilizándose la parte aérea secada en estufa a 65 °C durante 48 h. La masa foliar se molió y calcinó a 550 °C durante 8 h y las cenizas

se trataron con HCl para determinar Ca, Mg y Al por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), P mediante espectrofotometría usando el método del fosfomolibdatovanadato y N por el método Kjeldhal (Sadzawka *et al.*, 2004a). Para el tratamiento SAI<sub>4</sub> en el suelo testigo y en el inoculado con R-109 no se pudieron realizar los análisis anteriores por el escaso material vegetal obtenido.

*Suelo.* La determinación de pH se realizó potenciométricamente en relación suelo:agua (1:2,5) y el contenido de humedad se calculó secando el suelo en estufa a 105 °C por 24 h. El contenido de materia orgánica se determinó por digestión húmeda con dicromato en medio ácido (Walkley y Black, 1934) y el P disponible mediante extracción con NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M a pH 8,5 con posterior medición

espectrofotométrica (Olsen y Sommers, 1987). Los cationes intercambiables (Ca, Mg) fueron extraídos con  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1 M a pH 7,0 y analizados por EAA. El Al intercambiable se extrajo con KCl 1 M y se analizó por EAA (Sadzawka *et al.*, 2004b).

**Determinaciones microbiológicas.** El conteo de nódulos se realizó en raíces cuidadosamente lavadas junto con la observación cualitativa de tamaño y tonalidad interna, considerándose activos aquellos nódulos que presentaron coloración roja a rosada (apreciación: +++ y ++, respectivamente) por evidenciar presencia de leghemoglobina, mientras que el color blanco (apreciación: +) se consideró como nódulo joven.

Para la determinación de colonización por HMA se separaron cuidadosamente las raíces limpias de la parte aérea y al azar se cortaron trozos de 1 cm que se tiñeron según metodología descrita por Phillips y Hayman (1970) con posterior cuantificación de las estructuras fúngicas según método del intercepto de líneas (Giovannetti y Mosse, 1980). Las esporas HMA se aislaron desde el suelo de acuerdo con el método del tamizado y decantación húmeda seguido por centrifugación en gradiente de sacarosa con posterior cuantificación bajo lupa estereoscópica en placa de Doncaster (Sieverding, 1991). Finalmente, para la actividad fosfatásica ácida se siguió metodología propuesta por Tabatabai y Bremner (1969) con modificaciones realizadas por Rubio *et al.* (1990) para suelos derivados de cenizas volcánicas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayo I: selección de cepas de *Rhizobium* tolerantes a la acidez y Al

Las doce cepas de *Rhizobium* reproducidas en caldo levadura-manitol presentaron turbidez al cuarto día ( $T_4$ ), la que aumentó al día siguiente para comenzar a decaer el día 6 ( $T_6$ ), pudiendo clasificarse como especies de crecimiento rápido (Cleyet-Marel, 1983). Los *Rhizobium* de colección resultaron ser sensibles a la acidez, mostrando un bajo crecimiento en el caldo de pH 4,5 y presentando variaciones entre cepas a la tolerancia de Al (Figura 1A). En este estudio el pH se ajustó a una unidad más ácida que la propuesta por Ayanaba *et al.* (1983), mientras el medio ajustado a pH 6,0 (Figura 1B) se seleccionó de acuerdo con lo informado por

Octive (1990) quien después de adicionar distintas concentraciones de Al en el medio trabajó con el pH original. Diferencias de pH en las soluciones alteran la actividad y concentración de especies de Al por reacciones de disolución y precipitación en las fases sólidas o líquidas (Ritchie 1994, Campo y Wood, 2001), lo que explicaría el comportamiento de las cepas a los dos pH utilizados.

Una cepa que presentó distinta turbidez en los dos medios estudiados fue R-113; en el caldo ácido no presentó diferencias de crecimiento con los distintos niveles de Al, mientras en el caldo de pH 6,0 adicionado con el equivalente a 200  $\mu\text{M}$  de Al alcanzó la mayor turbidez al día 5 ( $T_5$ ). A la dosis de 100  $\mu\text{M}$  de Al no presentó diferencias con el testigo, mientras que con el tratamiento  $\text{Al}_3$  se inhibió su desarrollo mostrando, en general, mayor crecimiento en el medio de menor acidez. Las cepas 118, 119 y 121 a pH 6,0 presentaron turbidez al día 4, deteniéndose bruscamente su crecimiento al día siguiente (Figura 1B). Resultados similares mostrando variaciones en la tolerancia a Al entre cepas han sido informados por Taylor (1991) y Campo y Wood (2001).

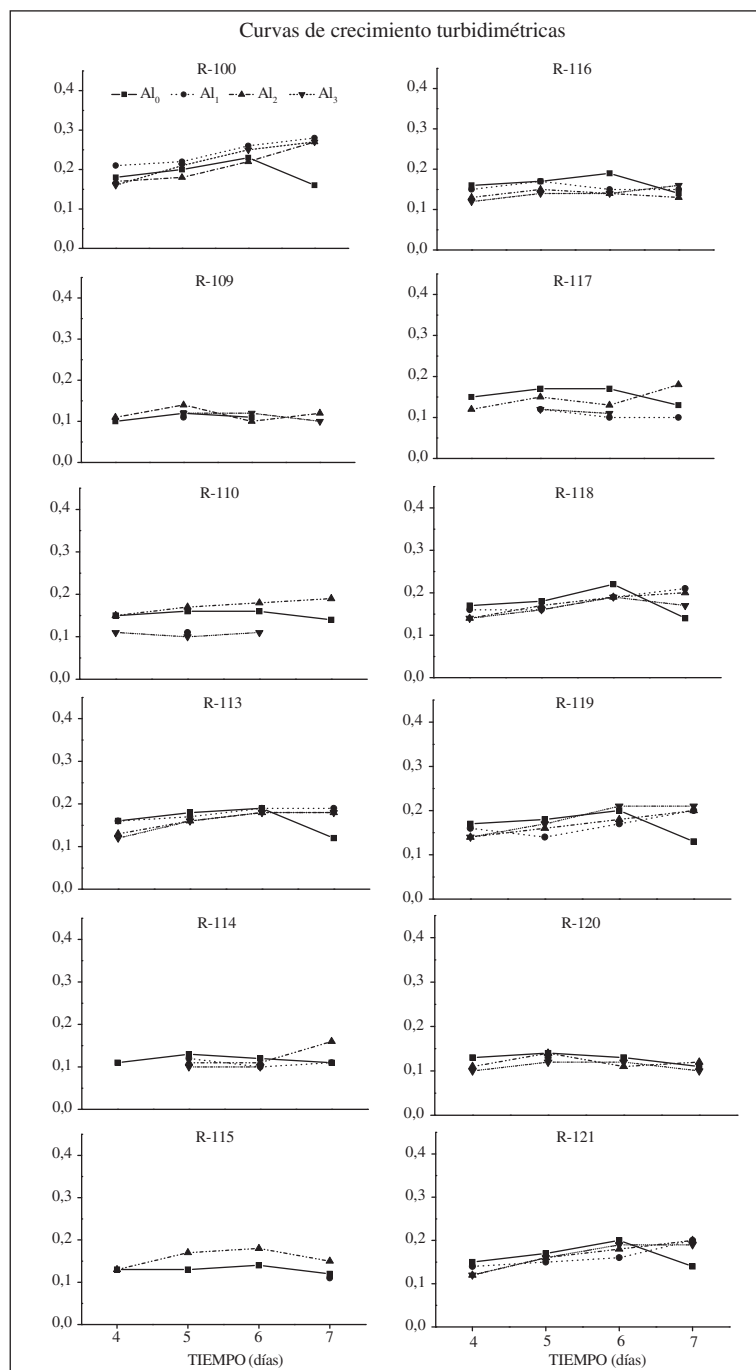
### Ensayo II: selección de cepas de *Rhizobium* de colección eficientes en *Trifolium pratense*

El mayor rendimiento acumulado a través de dos cortes lo presentó la inoculación de la cepa R-113 seguida por la cepa R-115, no encontrándose diferencias significativas entre los dos ecotipos de *Rhizobium* (Figura 2). La inoculación con cinco de las doce cepas de colección produjo diferencias de rendimiento en *T. pratense* comparadas con el testigo. Por esta razón, se seleccionaron como más eficientes los *Rhizobium* R-113 y R-115, resultados que fueron corroborados por el mayor crecimiento alcanzado por R-113 en caldo nutritivo a pH 6,0. Como tercera cepa se eligió R-109, por representar el comportamiento general observado en el resto de las cepas en caldo nutritivo o inoculadas en el Andisol.

### Ensayo III: eficiencia de inoculación con tres cepas de *Rhizobium* de colección en un Andisol con cuatro niveles de saturación de Al sobre *Trifolium repens*

En general, los rendimientos disminuyeron con el aumento en la saturación de Al del

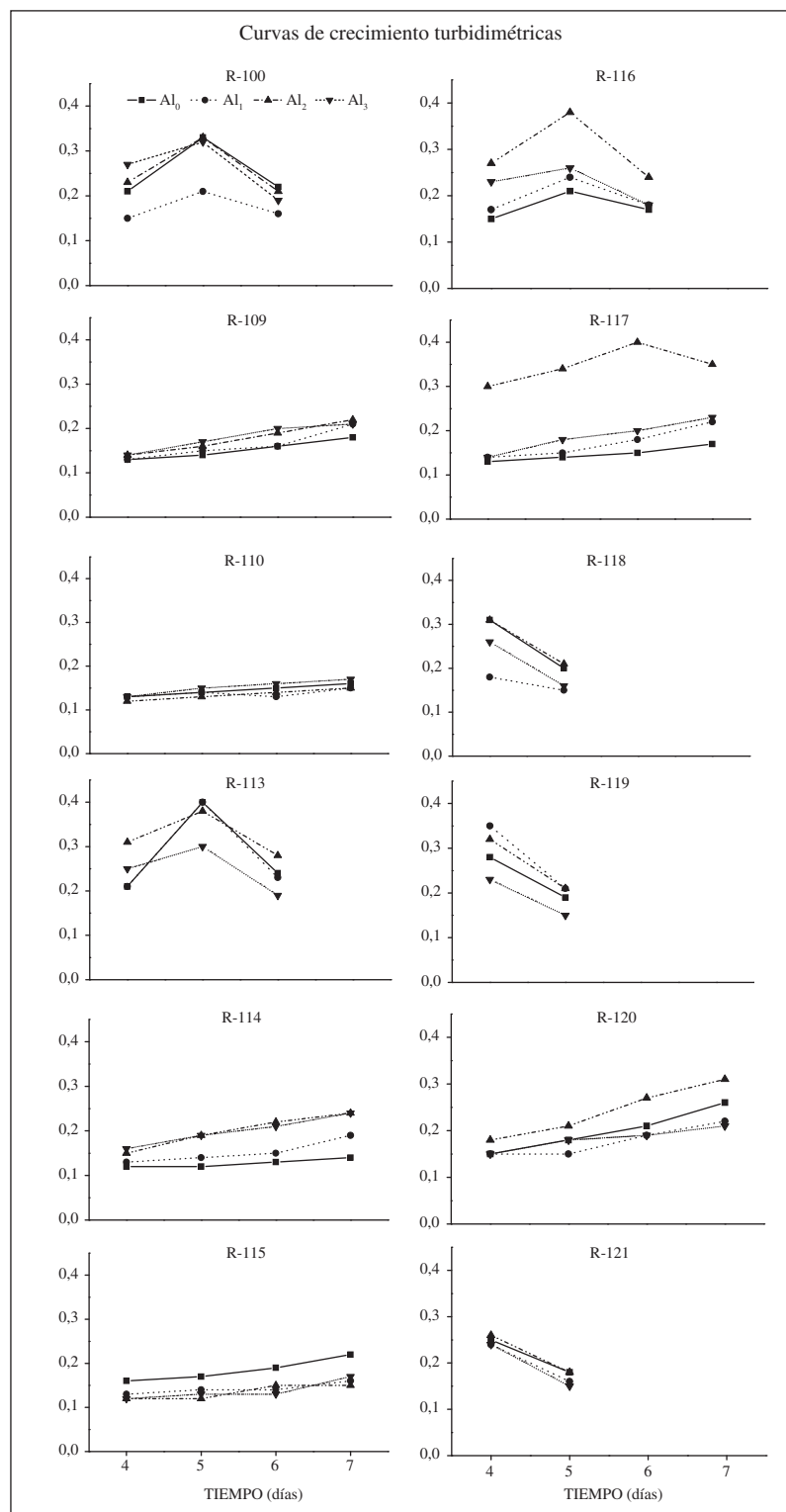




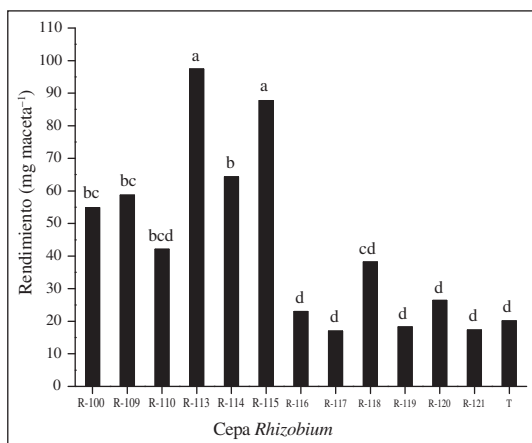
**Figura 1A.** Curvas de crecimiento de doce cepas de *Rhizobium* de colección en caldo levadura-manitol ajustado a pH 4,5 y cuatro niveles de Al (0- 100- 200- 300  $\mu$ M Al).

suelo (Figura 3A); la adición de cal disminuyó notablemente el porcentaje de saturación de Al (Cuadro 1), resultando favorecida la producción de trébol blanco que incrementó el rendimiento en un 23% en el testigo con cepas nativas como

consecuencia de las mejores condiciones edáficas alcanzadas en el tratamiento SAl<sub>1</sub> (0,9% de saturación de Al). En SAl<sub>1</sub> la inoculación con *Rhizobium* de colección mejoró los rendimientos en un 30% con R-109, 93,5% con R-113 y un 28% con R-115



**Figura 1B.** Curvas de crecimiento de doce cepas de *Rhizobium* de colección en caldo levadura-manitol ajustado a pH 6,0 y cuatro niveles de Al (0- 100- 200- 300  $\mu$ M Al).



**Figura 2:** Efecto de la inoculación de doce cepas de *Rhizobium* de colección en un Andisol serie Gorbea sobre el rendimiento acumulado a través de dos cortes de *Trifolium pratense*.

respecto a sus testigos con cepas nativas en el suelo sin adición de cal (SAI<sub>2</sub>). La adición de CaCO<sub>3</sub> en los suelos ácidos neutraliza el Al de la solución del suelo incrementando los contenidos de Ca, Mg, Mo y disminuyendo la acidez, lo que favorece las actividades biológicas de la rizósfera junto con estimular la mineralización del P-orgánico. En este trabajo, al descender drásticamente la saturación de Al a un promedio de 1%, las nuevas condiciones edáficas permitieron un ambiente favorable para el funcionamiento de la FBN. Los tratamientos con altos niveles de saturación de Al (SAI<sub>3</sub> y SAI<sub>4</sub>) presentaron bajos rendimientos de *T. repens*, no existiendo diferencias de materia seca entre las cepas nativas con las inoculadas por el daño que produjo el Al en el sistema radical, limitando la formación de nódulos y por tanto inhibiendo el proceso de FBN. Richardson *et al.* (1988) observaron en *T. repens* que el Al afectó el crecimiento de *Rhizobium trifolii* tanto en solución como en la rizósfera de la planta. Las especies y variedades dentro de las especies vegetales muestran grandes diferencias en la susceptibilidad a la toxicidad por Al (Ma, 2000), siendo las leguminosas las más susceptibles por el efecto detrimental producido en el proceso de nodulación (Kinraide, 1990). Con el porcentaje de saturación de Al mayor (SAI<sub>4</sub>) las cepas R-113 y R-115 resultaron ser las más tolerantes, con incrementos de aproximadamente 80% y 60% sobre el testigo con cepas nativas, mientras la cepa R-109 resultó ser la más sensible.

A través de los cortes se observó un aumento en la materia seca debido a las condiciones climáticas favorables que prevalecieron en el invernadero durante

el transcurso del ensayo, con mejores condiciones de luminosidad y temperatura que implicaron una mayor actividad fotosintética de las plantas y microorganismos, ya que la temperatura incide en la FBN como en las distintas etapas relacionadas con la formación y funcionamiento de los nódulos (Pinilla, 1983).

Respecto al proceso de FBN, en el suelo natural (SAI<sub>2</sub>) todas las cepas nodularon (Cuadro 2), pero sólo se observaron nódulos efectivos de color rojo en las raíces con cepas nativas (T<sub>0</sub>) y con R-109, los que probablemente se encontraban fijando N<sub>2</sub> por la presencia de leghemoglobina. La inoculación de R-113 y R-115 produjo nódulos blancos, señalando que estarían en una etapa de formación aún joven. La menor saturación de Al en el suelo (SAI<sub>1</sub>) incrementó la nodulación de las cepas nativas (T<sub>0</sub>), R-109 y R-113 por el aporte de Ca al Andisol; según Alva *et al.* (1990) el proceso de nodulación se resiente al descender el contenido de Ca y pH en el suelo; por el contrario, con R-115 el proceso de nodulación disminuyó.

Al aumentar la saturación de Al (SAI<sub>3</sub>) se inhibió completamente la actividad del microbionte. Wood *et al.* (1984) en soluciones de concentración de Al igual a 1,3 ppm encontraron toxicidad ya sea en el hospedero como inhibición en la multiplicación y nodulación de *Rhizobium*. En el tratamiento SAI<sub>4</sub> las cepas nativas y R-113 presentaron escasa nodulación. Según antecedentes de la literatura en determinadas circunstancias las cepas nativas resultan ser más eficientes que las de colección, por encontrarse mejor adaptadas a las condiciones edafoclimáticas, lo que incide en el proceso de FBN que resulta más eficiente (Urzúa y Torres, 1985).

En el Andisol, además de los microorganismos FN se encontraban presentes otros microorganismos importantes en el ciclo del P y que también forman asociaciones simbióticas con las leguminosas, los HMA. Tales hongos han demostrado actuar sinérgicamente con los *Rhizobium* en el proceso de FBN (Azcón *et al.*, 1991). De los parámetros fúngicos medidos como número de esporas HMA en el suelo, la mayor cantidad se aisló desde el tratamiento inoculado con R-113 y con el porcentaje más bajo de saturación de Al (Figura 3C), coincidiendo con el mayor rendimiento alcanzado por *T. repens* (Figura 3A), mientras que con la menor saturación de Al se inhibió la esporulación en el Andisol inoculado con R-115 que no presentó diferencias significativas con el testigo. Al respecto, Borie *et al.* (1990) encontraron



Cuadro 2

Efecto de la inoculación con tres cepas de *Rhizobium* de colección a un Andisol serie Gorbea con distinta saturación de Al sobre la nodulación de *Trifolium repens*

Dosis Al	Cepa	Nº nódulos	Apreciación*
SAI <sub>1</sub>	T <sub>0</sub>	22	++
	R-109	21	+++
	R-113	16	+
	R-115	9	+
SAI <sub>2</sub>	T <sub>0</sub>	6	+++
	R-109	14	++
	R-113	10	+
	R-115	21	+
SAI <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	0	-
	R-109	0	-
	R-113	0	-
	R-115	0	-
SAI <sub>4</sub>	T <sub>0</sub>	1	+
	R-109	0	-
	R-113	1	+
	R-115	0	-

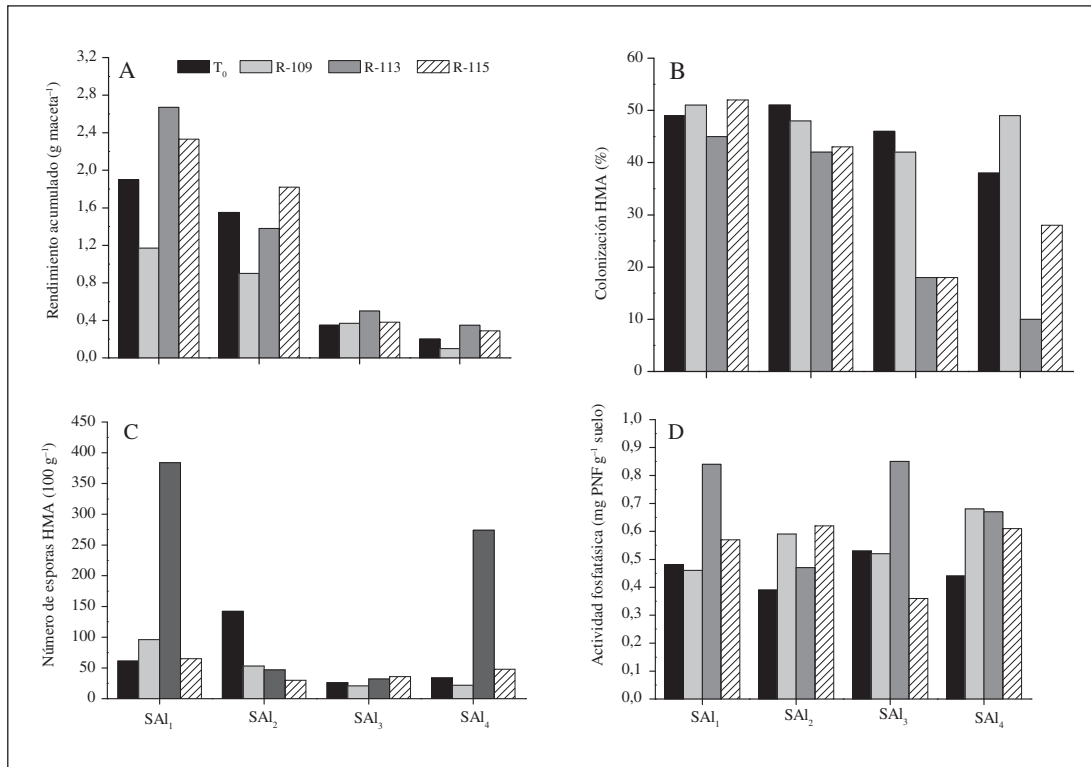
\*+: nódulos pequeños, redondos, algunos alargados blancos;  
 ++: nódulos pequeños, redondos y algunos alargados rojos;  
 +++: nódulos grandes, alargados, rojos.

que leguminosas crecidas en suelos adicionados de P-fertilizante y con una dosis intermedia de CaCO<sub>3</sub> la doble simbiosis *Rhizobium*-HMA funcionó en forma efectiva. El número de esporas fúngicas en el suelo de manera similar a los nódulos de las raíces fueron afectadas por la presencia de Al en el tratamiento SAI<sub>3</sub>, especialmente con la inoculación de la cepa R-109. Por el contrario, la inoculación con R-113 en SAI<sub>4</sub> produjo un notable aumento de esporas HMA con un incremento de un 600% sobre el testigo. El proceso de FBN requiere P, nutriente que es aportado por los HMA, pero la respuesta de la planta dependerá de una combinación particular de cepas de *Rhizobium* con los hongos, sugiriendo una compatibilidad específica entre hospedero y microorganismos asociados en la simbiosis tripartita (Azcón *et al.*, 1991).

Respecto al otro propágulo fúngico evaluado, la colonización HMA en las raíces de *T. repens*

presentó distinto comportamiento de acuerdo a la cepa de *Rhizobium* inoculada. La inoculación en el suelo natural (T<sub>0</sub>) produjo un descenso en la colonización por HMA en las raíces de trébol respecto al testigo, siendo más afectados los tratamientos inoculados con R-113 y R-115, no encontrándose grandes diferencias en el porcentaje de colonización HMA entre SAI<sub>1</sub> y SAI<sub>2</sub> (Figura 3B). Para los niveles tóxicos de Al, la inoculación con R-113 y R-115 produjo un descenso significativo de la colonización HMA en las raíces del trébol, mientras en SAI<sub>4</sub> la cepa R-109 incrementó la colonización en un 20% en relación al testigo. Según Siqueira *et al.* (1984) bajo condiciones de acidez un aumento en la disponibilidad de Al en la solución del suelo resulta ser un factor primordial de inhibición del desarrollo fúngico. Los beneficios de la simbiosis tripartita bacteria-HMA-leguminosa relacionados con el proceso de nodulación de las BFN y el establecimiento de las micorrizas arbusculares podrían ocurrir simultánea y sinérgicamente; así, mientras los hongos movilizan P desde el suelo las bacterias suministran N no sólo a la planta, sino que también a los HMA (Rabie *et al.*, 2005).

En general, la colonización de las raíces en el tratamiento con baja saturación de Al no presentó diferencias con el suelo original (SAI<sub>2</sub>) debido a que *T. repens* es una especie más tolerante a Al que *T. pratense*. Los propágulos HMA en el suelo con alta saturación de Al se comportaron en forma bastante infectiva pero poco efectiva de acuerdo con los rendimientos alcanzados (Figura 3A) especialmente en SAI<sub>4</sub> donde con la inoculación de R-109 se obtuvo la mayor colonización HMA asociada con el más bajo rendimiento. Por el contrario, la inoculación con R-113 resultó efectiva ya que se alcanzó una baja colonización asociada con el mayor rendimiento. El tratamiento SAI<sub>1</sub> inoculado con los *Rhizobium* R-109 y R-115 favoreció la colonización de los HMA nativos. De acuerdo con lo anterior, la diferencia encontrada en los porcentajes de colonización HMA entre las dos cepas R-109 y R-113 muestra que la respuesta del macrobionte dependerá de una combinación particular de cepas de *Rhizobium* y especies HMA, sugiriendo una cierta compatibilidad específica del hospedero con los microorganismos asociados en la simbiosis tripartita. Estos resultados se ven corroborados por lo informado por Ianson y Linderman (1989) y von Alten *et al.* (1989) quienes encontraron que la inoculación de cepas de *Rhizobium* produjeron



**Figura 3:** Efecto de la inoculación con tres cepas de *Rhizobium* de colección en un Andisol serie Gorbea con distinta saturación de Al sobre: A) rendimiento de *Trifolium repens*, B) colonización por HMA en las raíces, C) número de esporas HMA y D) actividad fosfatásica del suelo.

crecimientos diferentes en el hospedero de acuerdo con distintas combinaciones HMA. Sin embargo, Xavier y Germida (2003) encontraron en lenteja que una asociación *Rhizobium*-HMA incompatible redujo la eficacia de bacterias efectivas, mientras una compatible mejoró la eficiencia de una cepa inefectiva, lo que también podría ocurrir en otras leguminosas.

Además, en el suelo se determinaron las enzimas fosfatasas relacionadas con la mineralización del P orgánico. En SAI<sub>1</sub> la inoculación con la cepa R-113 favoreció los contenidos de enzima que se vieron incrementados en un 80% sobre el testigo. En SAI<sub>3</sub> nuevamente se produjo la mayor liberación de enzima, mientras en SAI<sub>4</sub> no se encontraron diferencias entre las cepas de colección (Figura 3D). Al respecto, Borie *et al.* (1998) encontraron en suelos con alta saturación de Al cultivados con trigo que la adición de enmienda aumentó el contenido de enzima en el suelo. En general, los contenidos de fosfatasas resultaron ser menores a los informados por Borie (1981) en Andisoles con lupino, leguminosa no micorrizable; sin embargo, la cuantía de

la enzima es diferente entre especies y cultivares dentro de una especie (Borie *et al.*, 1996). Por otra parte, Chong *et al.* (1987) informaron que el pH de la rizósfera al modificarse por los exudados excretados por las plantas posibilita la nodulación en los suelos ácidos.

#### ANÁLISIS DEL SUELO Y FOLIAR

El análisis químico del suelo muestra que el encalado aumentó el contenido de Ca, bases y CICE, disminuyendo el porcentaje de saturación de Al y el Al intercambiable, mientras que con el mayor nivel de Al se incrementó su saturación (Cuadro 1). Los tratamientos SAI<sub>3</sub> y SAI<sub>4</sub> movilizaron la menor cantidad de P, produciéndose la mayor movilización con SAI<sub>1</sub> señalando un efecto directo de la nutrición fosfatada por efecto de la micorrización. Al respecto, Asimi *et al.* (1980) encontraron un mayor contenido de P en leguminosas inoculadas con microorganismos asociados a las dos simbiosis. Por otra parte, la absorción y translocación de P y Ca se reduce por la presencia de Al (Andrew *et al.*, 1973).

Los contenidos minerales de los tejidos de *T. repens* principalmente el P fueron afectados por la toxicidad de Al (Cuadro 3). En el tratamiento SA1<sub>3</sub>, el contenido de Ca se alteró por la cepa R-109, mientras la inoculación con R-113 no afectó la concentración del nutriente a dosis tóxicas de Al, mostrando una tendencia similar R-115. Finalmente, los contenidos de Mg no fueron afectados ya sea por toxicidad de Al o inoculación con distintas cepas de *Rhizobium*.

*Rhizobium* previamente seleccionados, la asociación SA1<sub>1</sub>-*Trifolium repens*-*Rhizobium* R-113-HMA nativos presentó la mayor efectividad expresada como sinergismo positivo que incrementó la biomasa foliar del hospedero. En suelos ácidos del tipo Andisol que poseen una baja disponibilidad de P, el rol que cumplen los HMA como suministradores de P en simbiosis tripartita con leguminosas forrajeras sería importante cuando la fijación de N se encuentra restringida por un inadecuado suministro del nutriente.

## CONCLUSIONES

Niveles de toxicidad por Al afectaron el crecimiento de las doce cepas de colección; así, de los tres

## AGRADECIMIENTOS

A Probical Ltda. y al Proyecto Fondecyt 1950842.

**Cuadro 3**

**Análisis químico de *Trifolium repens* crecido en un Andisol serie Gorbea con distinta saturación de Al inoculado con tres cepas de *Rhizobium* de colección**

Dosis Al	Cepa	N (%)	P (%)	Ca (%)	Mg (%)	Al (µg g <sup>-1</sup> )
SA1 <sub>1</sub>	T <sub>0</sub>	4,85	0,30	1,57	0,26	1476
	R-109	4,81	0,27	1,81	0,29	632
	R-113	4,84	0,29	1,36	0,32	2430
	R-115	4,91	0,32	1,96	0,30	2033
SA1 <sub>2</sub>	T <sub>0</sub>	4,59	0,24	1,46	0,35	1335
	R-109	5,07	0,26	1,45	0,36	672
	R-113	4,51	0,29	1,13	0,36	1528
	R-115	4,84	0,31	1,45	0,35	1558
SA1 <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	–	0,09	1,11	0,35	925
	R-109	6,73	0,09	1,05	0,35	781
	R-113	7,75	0,12	1,08	0,34	465
	R-115	6,21	0,10	1,21	0,34	650
SA1 <sub>4</sub>	T <sub>0</sub>	7,21	–	–	–	–
	R-109	7,24	–	–	–	–
	R-113	6,67	0,22	1,39	0,34	920
	R-115	6,53	0,11	1,29	0,34	806

## LITERATURA CITADA

- ALVA, A.K.; ASHER, C.J. Y EDWARDS, D.G. 1990. Effect of solution pH, external calcium concentration, and aluminium activity on nodulation and early growth of cowpea. *Aust. J. Agric. Res.* 41: 359-365.
- ANDREW, C.; JOHNSON, A. Y SANDLAND, R. 1973. Effect of aluminium on growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. *Australian J. Agric. Res.* 24: 325-339.
- AQUIAHUATI, M.A. Y PÉREZ, M.L. 2004. Manual de prácticas de laboratorio Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana. Serie Publicaciones CBS. México. 123 pp.
- ASIMI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Y GIANINAZZI, S. 1980. Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between VAM and *Rhizobium* in soybeans. *Can. J. Bot.* 58: 2200-2205.
- AYANABA, A.; ASANUMA, S. Y MUNNS, D.N. 1983. An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminium stress. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47: 256-268.
- AZCÓN, R.; RUBIO, R. Y BAREA, J.M. 1991. Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains and their effect on growth  $N_2$  fixation ( $^{15}N$ ) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytol.* 117: 399-404.
- BARRIENTOS, L.; CAMPILLO, R. Y MÉNDEZ, E. 1994. La acidez del suelo y su efecto sobre la fijación simbiótica de N en leguminosas forrajeras. *Agric. Tec.* 54: 118-123.
- BORIE, F. 1981. Caracterización de diversas fracciones de P en andisoles chilenos y significado de los microorganismos, con especial referencia a las micorrizas, en el aporte de dicho macronutriente a las plantas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España. 191 p.
- BORIE, F.; RUBIO, R.; MORAGA, E. Y NAOUR, E. 1990. Efecto de la inoculación conjunta de hongos MVA y *Rhizobium* en el crecimiento y nutrición de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.). Academia de Ciencias de Cuba. I Simposio Latinoamericano de micorrizas. La Habana. Cuba. p. 14.
- BORIE, F.; RUBIO, R.; MORAGA, E. Y MORALES, A. 1996. Efecto de la roca fosfórica sobre la doble simbiosis de hongos micorrizógenos-VA y *Rhizobium trifolii* en trébol rosado. *Agric. Tec.* 56: 237-243.
- BORIE, F.; RUBIO, R. Y SCHALCHLI, C. 1998. Micorrizas arbusculares y actividad fosfatásica de diez cultivares de trigo. *Agric. Tec.* 58: 47-55.
- CAMPILLO, R. 1997. Fijación biológica de nitrógeno: mejorando praderas. *Revista Tattersall* 3: 4-6.
- CAMPO, R.J. Y WOOD, M. 2001. Residual effects of successive exposure of soybean *Bradyrhizobium* strains to aluminium on solid defined medium. *Pesq. agropec. bras.* 36: 1399-1407.
- CHONG, C.; CLINE, R.A. Y RINKER, D.L. 1987. Spent mushroom compost and papermill sludge as soil amendments for containerized nursery crops. *Proc. International Plant Propagators Soc.* 37:347-353.
- CLEYET-MAREL, J. (1983). Preparation of a *Rhizobium* culture medium, in Technical Handbook on Symbiotic Nitrogen fixation. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome. 87 p.
- DE-POLLI, H., FRANCO, A.A., ALMEIDA, D.L., DUQUE, F.F., MONTEIRO, E.M. Y DÖBEREINER, J. (1988). A biologia do solo na agricultura. Embrapa- UAPNPBS, Rio de Janeiro. 48 p.
- DUNCAN, D. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometric* 11: 1-42.
- FAGERIA, N.K. Y STONE, L.F. 2006. Physical, Chemical, and Biological Changes in the Rhizosphere and Nutrient Availability. *J. Plant Nutr.* 29: 1-30.
- GIOVANNETTI, M. Y MOSSE, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in root. *New Phytol.* 84: 428-500.
- HELYAR, K.R. 2003. The symptoms and effects on plants of nutrient disorders in acid soils. 3<sup>rd</sup> Australian New Zealand Soils Conference University of Sydney, Australia.
- HUNGRIA, M. Y VARGAS, M.A.T. 2000. Environmental factors affecting N-2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res.* 65: 151-164.
- IANSON, D. Y LINDERMAN, R. 1989. Variation in VA mycorrhiza strain interactions with *Rhizobium* on pigeon pea. In: The rhizosphere and plant growth. Beltsville Symposium XIV, Maryland. p. 61.
- KINRAIDE, T. 1990. Assessing the rhizotoxicity of the aluminate ion,  $Al(OH)_4^-$ . *Plant Physiol.* 94: 1620-1625.
- MA, J.F.; TAKETA, S. Y YANG, Z.M. 2000. Aluminium tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiol.* 122: 687-694.
- MORA, M.L. Y BARROW, N. 1996. The effects of time of incubation on the relation between charge and pH of soil. *European J. Soil Sci.* 47: 131-136.
- MORA, M.L. Y DEMANET, R. 1999. Uso de enmiendas calcáreas en suelos acidificados. *Frontera Agrícola* 5: 43-58.
- MORA, M.L.; ALFARO, M.A.; WILLIAMS, P.H.; STEHR, W. Y DEMANET, R. 2004. Effect of fertilizar input on soil acidification in relation to growth and chemical composition of a pasture and animal production. *Rev. Cs. Suelo Nutr. Planta* 4: 29-40.
- MORA, M.L.; ALFARO, M.A.; JARVIS, S.C.; DEMANET, R. Y CARTES, P. 2006. Soil aluminium availability of southern Chile and its effect on forage production and animal metabolism. *Soil Use Manage.* 22: 95-101.
- OCTIVE, J.C. (1990). Mutagenic effects of aluminium on rhizobia and bradyrhizobia. Ph.D. Thesis. University of Reading. 207 p.
- OLSEN, S.R. Y SOMMERS, L.E. (1987). Phosphorus. in *Methods of Soil Analysis: Chemical and Microbiological Properties*. Series Agronomy Part, N° 2. Page, A.L., Millar, R., Keeney, D.R. (eds.). Am. Soc. Agron., Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- PHILLIPS, J. Y HAYMAN, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. British Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- PINILLA, H. 1983. Efecto del uso sucesivo de nitrógeno nítrico y amoniacal en la acidificación de suelos trumaos. *Frontera Agrícola* 1: 18-22.
- RABIE, G.H.; ABOUL-NASR, M.B. Y AL-HUMIANY, A. 2005. Increased salinity tolerance of cowpea plants by dual

- inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* and a nitrogen-fixer *Azospirillum brasilense*. *Mycobiology* 33: 51-60.
- RICHARDSON, A.; DJORDJEVIC, M.; ROLFE, B. Y SIMPSON, R. 1988.** Effect of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *Plant Soil* 109: 37-47.
- RITCHIE, G.S.P. 1994.** Role of dissolution and precipitation of minerals in controlling soluble aluminium in acid soils. *New York. Adv. Agron.* v 53, p. 47-83.
- RUBIO, R.; MORAGA, E. Y BORIE, F. 1990.** Acid phosphatase and vesicular-arbuscular mycorrhizal infection associated with roots of four wheat cultivars. *J. Plant Nutr.* 13: 585-598.
- SADZAWKA, A.; GREZ, R.; MORA, M.L.; SAAVEDRA, N.; CARRASCO, M.A.; FLORES, H. Y ROJAS, C. 2004a.** Métodos de Análisis de Tejidos Vegetales. Comisión de Normalización y Acreditación, (CNA) Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, Chile.
- SADZAWKA, A.; GREZ, R.; MORA, M.L.; SAAVEDRA, N.; CARRASCO, M.A.; FLORES, H. Y ROJAS, C. 2004b.** Métodos de Análisis Recomendados para los Suelos Chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación, Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, [http://www.inia.cl/platina/pubbycom/edinia/does/metodos\\_an\\_suelos\\_v2004.pdf](http://www.inia.cl/platina/pubbycom/edinia/does/metodos_an_suelos_v2004.pdf).
- SIEVERDING, E. 1991.** Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystem. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn, Germany.* 371 pp.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D. Y MAHMUD, H. 1984.** Effect of living on spore germination germ tube growth and root colonization by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 76: 115-124.
- STAMFORD, T.; MONTENEGRO, L.; ARAÚJO, J.M. Y STAMFORD, N.P. 1998.** Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 18: 382-385.
- TABATABAI, M. Y BREMNER, I. 1969.** Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1: 301
- TAYLOR, G.J. 1991.** Current views of the aluminium stress response: the physiological basis of tolerance. *Curr. Top Plant Biochem. Physiol.* 10: 57-93.
- URZÚA, H. Y TORRES, M. 1985.** Fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la zona Sur de Chile. II Respuesta a la inoculación con cepas efectivas de *Rhizobium trifolii* en suelos derivados de cenizas volcánicas. *Ciencia e Investigación Agraria* 12: 15-21.
- VON ALTEN, H.; TANNEBERG, A. Y SCHONBECK, F. 1989.** Specific interaction of *Bradyrhizobium* and four VA mycorrhizal isolates in soybean, in *The Rhizosphere and Plant Growth. Beltsville Symposium XIV, Maryland.* 65 pp.
- WALKLEY, A. Y BLACK, I.A. 1934.** An examination of the Degiareff method for determining SOM and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-38.
- WOOD, M.; COOPER, J. Y HOLDING, A. 1984.** Soil acidity factors and nodulation of *Trifolium repens*. *Plant Soil* 78: 367-369.
- XAVIER, L.J.C. Y GERMIDA, J.J. 2003.** Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae enhance pea yield and nutrition. *Biol. Fertil. Soils* 37: 261-267.
- YANG, X.; WANG, W.; YE, Z.; HE, Z. Y BALIGAR, V.C. 2004.** Physiological and genetic aspects of crop plant adaptation to elemental stresses in acid soils, in *The Red Soils of China.* Wilson, M.J., He, Z., Yang, X. (eds.). Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 171-218 pp.