

# EFFECTO DE LA ROCA FOSFÓRICA SOBRE LA DOBLE SIMBIOSIS DE HONGOS MICORRIZÓGENOS-VA Y *Rhizobium trifolii* EN TRÉBOL ROSADO<sup>1</sup>

## Effect of phosphoric rock on dual symbiosis of VA mycorrhizal fungi and *Rhizobium trifolii* on red clover

Fernando Borie B.<sup>2</sup>, Rosa Rubio H.<sup>2</sup>, Elvira Moraga P.<sup>2</sup> y Alfredo Morales L.<sup>2</sup>

### SUMMARY

A typical Andisol of southern Chile was used for carrying out a pot experiment with the dual symbiosis VA-mycorrhiza and rhizobium. The soil was fertilized with rock phosphate (RP) and triple superphosphate (TSP) and inoculated with both a native VAM fungus strain (*Glomus etunicatum* CH 110), and a *Rhizobium trifolii* strain. Red clover (*Trifolium pratense* L.) was used as a host plant.

Five shoot cuts were performed during the six months of the experiment and dry weights were recorded. At the end of the experiment yield, number of nodules, % VAM root infection and N and P mobilized were determined.

Results show that the best response was obtained with the VAM fungus addition and using RP as the P source. There was a close relationship between N and P mobilized, number of nodules and % VAM root infection. From the results obtained it was demonstrated the synergic effect of the dual symbiosis occurring in soils derived from volcanic ashes. This is a favorable situation to better know the performance of the prairies of Southern Chile.

**Key words:** red clover, VA mycorrhiza, *Rhizobium trifolii*, rock phosphate.

### INTRODUCCIÓN

Entre los procesos dinámicos relacionados con la nutrición mineral de las plantas cobran especial relevancia, a nivel radical, las interacciones que se manifiestan entre los microorganismos de la rizósfera, debido a que las transformaciones que ellos producen van a ejercer, directa o indirectamente, efectos que pueden ser cruciales para la producción agrícola. El conocimiento de estos procesos es esencial para un adecuado manejo de los suelos, así como también, para el uso racional de fertilizantes o insumos manufacturados, los que contribuyen al incremento en los costos de producción y, en ocasiones, pueden representar amenazas al medio ambiente si no son utilizados adecuadamente (Siqueira y Franco, 1988).

De particular interés resultan ser los hongos micorrizógenos vesículo-arbusculares (MVA), que afectan decisivamente la composición de las poblaciones microbianas, especialmente *Rhizobium*, ya que ambos microorganismos colonizan el sistema radical

de plantas huéspedes comunes, como son las leguminosas (Azcón *et al.*, 1991). El sinergismo que existe entre ambas simbiosis puede ser decisivo para la captación de nutrientes y fijación de N<sub>2</sub>, lo cual se traduce en una mayor absorción de dichos elementos, especialmente P y una mejor nodulación y actividad nitrogenasa del huésped, efecto que ha sido informado para diversas leguminosas (Hardie y Leyton, 1981; Saif, 1986; Urzúa *et al.*, 1992), especialmente en suelos con bajos niveles de P disponible (Cardoso, 1985; Mosse, 1987).

Por otra parte, se han realizado diversos estudios sobre la efectividad de la simbiosis en la captación de P desde suelos adicionados de fertilizantes poco solubles, tecnologías consideradas de bajo costo (Mosse *et al.*, 1976; Ross y Gillian, 1973), existiendo en la actualidad un consenso generalizado de que la simbiosis mejora sustantivamente el aprovechamiento del P desde fosfatos naturales (Pairunan *et al.*, 1980; Cardoso, 1985; 1986; Andrade *et al.*, 1996), debido a que las hifas de los hongos MVA tienen una capacidad de explorar un mayor volumen de suelo y en forma más eficiente que las raíces de la planta huésped. Este incremento en la captación de P desde la solución del suelo provoca un desequilibrio entre los iones que se encuentran en solución y los que están precipitados, en el sentido de una mayor

<sup>1</sup>Recepción de originales: 23 de enero de 1995.  
Financiado por FONDECYT 571-92, Dirección de Investigación-UFRO 9241-92 y 9439.

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

solubilización, previo a que ocurra la reprecipitación con iones Al o Fe (Cardoso y Lambais, 1992). Adicionalmente, en el último tiempo, se ha demostrado que, al igual que las raíces de los vegetales, los hongos MVA poseen actividad fosfatásica ácida (Tarafdar y Marschner, 1994) lo que les permitiría, en el caso de los suelos volcánicos del sur de Chile, un mejor aprovechamiento del alto nivel de P orgánico presente en ellos (Borie y Zunino, 1983; Borie *et al.*, 1989).

La aplicación directa de RF como fertilizante ha recibido considerable interés en los años recientes. Después de su aplicación al suelo, la RF entrega gradualmente P soluble a través de varias reacciones, entre las cuales es posible mencionar, la acción solubilizadora de la microflora libre, especialmente hongos (Borie *et al.*, 1983), y la acidificación producida por el sistema radical, en especial el de leguminosas, las que en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno liberan H<sup>+</sup> acidificando significativamente el entorno de sus raíces (Bolan *et al.*, 1990). Adicionalmente, la captación de P desde fuentes insolubles como lo son las RF, puede ser diferentemente afectada según el tipo de plantas a las que se les adiciona este tipo de fertilizantes. Así, se ha determinado que plantas con un sistema radical de baja capacidad de intercambio catiónico (CIC), como son, entre otras, gramíneas y cereales, se benefician poco o nada con la adición de RF (Kucey *et al.*, 1989).

Desde el punto de vista de la producción vegetal, las leguminosas son, indudablemente, un caso especial puesto que, como consecuencia de la infección simultánea con *Rhizobium* y con hongos micorrizógenos-VA, ellas pueden recibir los beneficios de una mejor nutrición en N y P, además de las interacciones N-P (Munns y Mosse, 1986). Así, la doble simbiosis no sólo reduce la necesidad de adicionar fertilizantes sintéticos, ahorrando energía, sino que también reduce el costo total del sistema, en términos de consumo de fotosintato (Kucey *et al.*, 1989).

De aquí que el objetivo del presente trabajo fue evaluar, en condiciones de invernadero, el efecto sobre el rendimiento de trébol rosado de la doble inoculación de un hongo MVA nativo junto a una cepa de *Rhizobium*, en un suelo típico de la IX Región adicionado de dos fuentes fosfatadas, superfosfato triple y roca fosfórica nacional, Bahía Inglesa, la que ha demostrado ser altamente reactiva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó bajo condiciones de invernadero, utilizando macetas de 700 g de capacidad conteniendo un suelo trumao serie Temuco

(Cuadro 1), mezclado con arena y vermiculita (70:30:5), según lo señalado por Azcón *et al.* (1991). Para eliminar los hongos MVA nativos, el suelo se esterilizó durante cuatro minutos, de acuerdo a Rubio *et al.* (1994), en horno microondas por tres días consecutivos a un 70% de capacidad de campo. Este sencillo sistema de esterilización ha demostrado ser el que provoca mínimos cambios en las propiedades físico-químicas de estos. Como planta huésped se utilizó trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) colocando nueve semillas pregerminadas por maceta, previamente desinfectadas con cloramina T.

CUADRO 1. Características químicas del suelo utilizado

TABLE 1. Soil chemical properties

pH	P-Olsen	N disponible	Iones de intercambio (cmol(+)/kg)			
			Al <sup>3+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>
6,32	16	17	trazas	1,5	10,03	0,83

Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: suelo estéril (-M) y suelo estéril inoculado con una cepa nativa de hongo MVA, *Glomus etunicatum* CH-110 (Morton y Bentivenga) (Mi), sin adición de fósforo (P<sub>0</sub>) y con una dosis equivalente a 300 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> como superfosfato triple (SFT) o como roca fosfórica Bahía Inglesa (RF, con 18,4% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Se utilizaron cuatro repeticiones en un diseño experimental factorial 2 x 3.

Todas las macetas se inocularon con *Rhizobium trifolii* de colección, reproducido en medio Allen (Allen y Allen, 1981) y se les adicionó 10 mL de un filtrado de suelo, exento de hongos micorrizógenos-VA, en orden a mantener la microflora de vida libre. Cada 15 días se añadió a cada maceta, 10 mL de solución nutritiva de Long Ashton, exenta de N y P (Hewitt, 1966).

Se realizaron cinco cortes de la parte aérea a los dos, tres, cuatro, cinco y seis meses. Los parámetros medidos, al término del experimento, fueron: a) en las raíces: recuento del número de nódulos y determinación del porcentaje de infección por hongos MVA, mediante la tinción de Phillips y Hayman (1970), cuantificada de acuerdo con el método del intercepto de líneas (Giovannetti y Mosse, 1980); b) en la parte aérea: fósforo foliar mediante el método sulfomolibdico/ácido ascórbico y nitrógeno total por el método de Kjeldahl, previa digestión ácida. Además, se determinó rendimiento en base a materia seca y la relación raíz/parte aérea.

En el tratamiento estadístico de los datos se aplicó, primeramente, la prueba para normalidad de Shapiro y Wilk (1965) para verificar normalidad. Las variables medidas que no presentaron normalidad se transformaron a valores arcoseno, luego se efectuó un análisis de variancia y, finalmente, se aplicó la prueba de Duncan (Duncan, 1955).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En Cuadro 2 y Figura 1 se muestran, respectivamente, los resultados del peso aéreo seco obtenido en trébol rosado a través de cada uno de los cinco cortes, conjuntamente con el total de materia seca acumulada. En ellos se observa que en los tratamientos sin la adición de P-fertilizante, el aprovechamiento del P nativo o residual, si bien fue mayor con el inóculo introducido (Mi) éste fue significativo tan sólo durante el primer y segundo corte indicando, por tanto, un agotamiento del P disponible a los tres meses. En cambio, cuando se agregó fosfato soluble, aunque se produjo un incremento en el rendimiento de algunos cortes, en la mayoría de los tratamientos, éste no fue significativo, a diferencia de la forma insoluble RF, la que demostró un claro efecto en el

**CUADRO 2. Efecto de la adición de dos fuentes fosfatadas en el Rendimiento (g) de trébol rosado inoculado con hongos MVA, a través de cinco cortes**

**TABLE 2. Effect of two phosphate sources on the yield of red clover inoculated with VAM fungi through out five cuts**

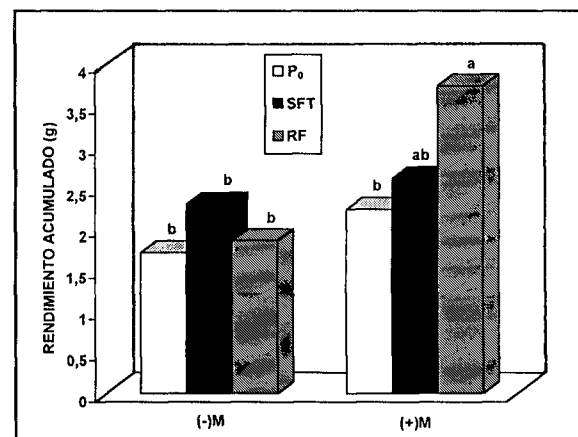
Corte	Fuente de P	Tratamiento	
		M(-)	M(+)
1	P <sub>0</sub>	0,043 c	0,223 a
	SFT	0,093 b	0,136 b
	RF	0,096 b	0,216 a
2	P <sub>0</sub>	0,054 b	0,245 a
	SFT	0,135 bc	0,171 ab
	RF	0,207 a	0,300 a
3	P <sub>0</sub>	0,209 b	0,402 b
	SFT	0,510 ab	0,445 b
	RF	0,390 b	0,801 a
4	P <sub>0</sub>	0,607 a	0,570 a
	SFT	0,796 a	0,668 a
	RF	0,548 a	1,056 a
5	P <sub>0</sub>	0,792 b	0,793 b
	SFT	0,759 b	0,859 b
	RF	0,613 b	1,361 a

En cada corte, medias (4 repeticiones) de cada variable con distinta letra, indican diferencias significativas (Duncan P ≤ 0,05).

crecimiento a partir del tercer corte (cuarto mes). Este aumento en el rendimiento obtenido con la inoculación de un hongo micorrizógeno efectivo, con respecto al suelo testigo esterilizado sin la adición de roca se debe tanto a la inoculación con MVA como al efecto de la roca. Con respecto a los tratamientos con adición de las dos formas de P-fertilizante, en el corte 1, se puede observar que hubo diferencias significativas entre los tratamientos M(-) SFT y M(+) RF, lo que se debe principalmente a la inoculación con hongos MVA y a la interacción con las dos fuentes de P.

Estos resultados son coincidentes con los encontrados por Bermúdez *et al.* (1996), los cuales al añadir RF a suelos inoculados con hongos MVA mejoraron el crecimiento de *Vicia faba*. Por otra parte, Saif (1986) encontró que leguminosas tropicales se beneficiaron con la doble simbiosis hongos MVA-*Rhizobium*, mejorando su rendimiento y utilizando mejor la RF. La mayor eficiencia en el uso del P desde formas insolubles, especialmente rocas fosfóricas se debe, más que al pH de un suelo en particular, al entorno ácido de las raíces, efecto que es muy pronunciado en leguminosas, en particular trébol (Borie *et al.*, 1992). En cuanto al efecto beneficioso de los hongos MVA sobre leguminosas adicionadas de roca fosfórica pareciera ser una materia ampliamente admitida, de acuerdo al trabajo de revisión de Barea y Azcón (1983).

Los resultados beneficiosos de la inoculación con *Glomus* son coincidentes con el número de nódulos (Cuadro 3), donde, si bien se observó una mayor cantidad con la adición de fertilizantes fosfatados



**FIGURA 1. Efecto de la adición de dos fuentes fosfatadas sobre el rendimiento acumulado (g) de trébol rosado inoculada con hongos MVA.**

**FIGURE 1. Effect of the addition of two phosphate sources on the accumulated yield (g) of red clover inoculated with VAM fungi.**

éste solamente fue significativo con la roca fosfórica, respecto al testigo sin micorriza. Al respecto, Asimi *et al.* (1980) encontraron que el peso seco de los nódulos del huésped fue incrementado significativamente con la adición de un hongo efectivo junto a la roca fosfórica, resultando siempre en una mejor captación de N.

Aunque Sieverding y Galvez (1988), encontraron en suelos tropicales, que la efectividad de los hongos MVA sobre cassava (*Manihot esculenta* Crantz) era independiente de las fuentes de P aplicadas a los suelos, Mosse (1981) por el contrario, informa que las fuentes de P soluble disminuyen el porcentaje de infección por MVA, mientras que las RF tienen efecto positivo. Según el trabajo de revisión de Barea y Azcón (1983), esto último es la tendencia mayormente informada; con respecto a los resultados aquí expuestos (Cuadro 3) muestran que, aunque no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de infección con las dos fuentes de P, la infectividad de las MVA fue similar, pero la efectividad depende de la interacción MVA x fuente de P soluble. La relación peso raíz/peso parte aérea, señala el beneficio que obtiene una planta cuando está micorrizada; así, mientras menor sea esta relación, el sistema radical del huésped será más pequeño, señalando que la simbiosis está siendo efectiva, reemplazando en parte, la función movilizadora de nutrientes que realiza la raíz (Azcón y Ocampo, 1981); el tratamiento M(+) RF no presentó diferencias significativas con el tratamiento P<sub>0</sub>, pero el mayor peso aéreo sugiere que el trébol es dependiente del hongo simbiote.

La inoculación del hongo MVA produjo un incremento tanto en N (Figura 2) como P (Figura 3) movilizado por el trébol, aunque éste sólo fue significativo con RF, como consecuencia de la efectividad del hongo y número de nódulos (Cuadro 3). El incremento en P, en cambio indicaría el efecto directo de la nutrición fosfatada sobre el rendimiento, producto de la micorrización. Lo anterior concuerda con Asimi *et al.* (1980), quienes encontraron un alto contenido de P en leguminosas inoculadas con los microorganismos que producen ambas simbiosis.

Se sabe que las MVA son muy efectivas, principalmente en suelos deficitarios de P o cuando se adicionan formas insolubles de P. En este estudio, realizado en un suelo con nivel medio de P disponible, la no respuesta a la inoculación de MVA con la adición del fertilizante soluble (SFT), contrasta fuertemente con aquella lograda con la misma dosis de P proveniente de roca fosfórica, enfatizando la importancia que posee, desde el punto de vista práctico, un buen manejo de la fertilización fosfatada de modo tal que se potencie al máximo el efecto ecológico natural que poseen las MVA.

Los resultados aquí entregados, en torno al beneficio logrado por trébol rosado con el efecto de la interacción hongo micorrizógeno VA y *Rhizobium trifolii*, corroboran lo informado por Urzúa *et al.* (1993), quienes encontraron similar efecto en trébol blanco y estimula a estudiar, con mayor profundidad, el efecto de las rocas fosfóricas reactivas nacionales en el establecimiento de praderas, en especial donde el componente de leguminosas sea significativamente mayor que en praderas naturalizadas, en las que el trébol representa, según Campillo y Demanet (1993), entre un 5 a un 20%.

**CUADRO 3. Número de nódulos, porcentaje infección por hongos MVA y relación raíz/tallo en trébol rosado, por efecto de la adición de dos fuentes fosfatadas**

**TABLE 3. Number of nodules, infection percentage by VAM fungi and root/shoot ratio on red clover, by effect of the addition of two phosphate sources**

Tratamiento	Número de nódulos			Infección por hongos MVA, %			Relación R/S		
	P <sub>0</sub>	SFT	RF	P <sub>0</sub>	SFT	RF	P <sub>0</sub>	SFT	RF
M(-)	166 b	225 ab	180 b	-	-	-	0,927 ab	1,183 a	0,823 b
M(+)	158 b	309 ab	379 a	30,5 a	34,7 a	36,0 a	0,860 b	1,027 ab	0,907 ab

En cada variable, medias (4 repeticiones) con distinta letra, indican diferencias significativas (Duncan  $P \leq 0,05$ ).

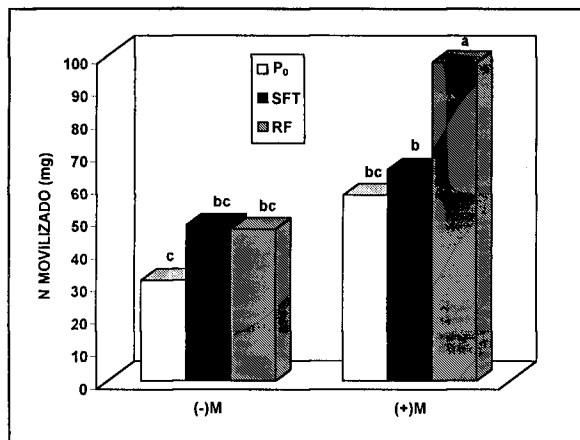


FIGURA 2. Efecto de la adición de dos fuentes fosfatadas sobre el N movilizado (mg) en el trébol rosado inoculado con hongos MVA.

FIGURE 2. Effect of the addition of two phosphate sources on the mobilized N (mg) in red clover inoculated with VAM fungi.

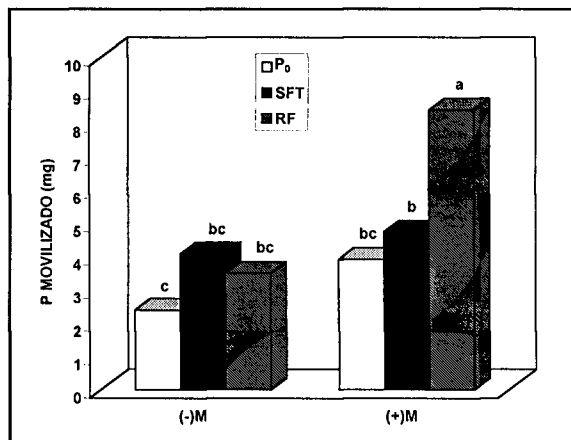


FIGURA 3. Efecto de la adición de dos fuentes fosfatadas sobre el P movilizado (mg) en el trébol rosado inoculado con hongos MVA.

FIGURE 3. Effect of the addition of two phosphate sources on the mobilized P (mg) in red clover inoculated with VAM fungi.

**CONCLUSIONES**

La adición de un fertilizante fosforado insoluble como la roca fosfórica Bahía Inglesa (RF) al suelo trumao exento de MVA, no fue efectiva para un buen crecimiento de trébol rosado inoculado con *Rhizobium*. Sin embargo, la inoculación del mismo suelo con una cepa efectiva de un hongo micorrizógeno VA duplicó el rendimiento a partir del cuarto mes del establecimiento en maceta, cuando a ésta se adicionó la misma RF.

La mayor movilización de N y P por la planta, se obtuvo con la inoculación del hongo MVA y la utilización de RF, coincidiendo con el número de nódulos, lo que significaría que ambas simbiosis funcionaron sinérgicamente en trébol rosado y que el hongo introducido fue bastante efectivo con el fertilizante de entrega lenta. Lo anterior sugiere mayores estudios en cuanto a la utilización de rocas fosfóricas en el establecimiento de praderas, en especial en aquellas donde el componente leguminosa fuera importante.

**RESUMEN**

En un experimento en macetas tendiente a estudiar el efecto de la doble simbiosis micorrizas-VA-*Rhizobium*, se utilizó un andisol del sur de Chile fertilizado con roca fosfórica (RF) y superfosfato triple (SFT) e inoculado con un hongo micorrizógeno VA nativo (*Glomus etunicatum* CH-110) y *Rhizobium trifolii*, usando trébol rosado como planta huésped.

El mayor rendimiento se obtuvo con la inoculación del hongo MVA y usando RF, como fuente de P. Se encontró una estrecha correlación entre cantidad de N y P movilizado por la planta con el número de nódulos y porcentaje de infección de las raíces por MVA. De estos resultados se puede concluir que las dos simbiosis funcionaron sinérgicamente en ese suelo, lo que es auspicioso para una mejor comprensión del comportamiento de las praderas del sur de Chile frente a la fertilización fosfatada.

Se realizaron cinco cortes de la parte aérea de la planta durante los seis meses en que se desarrolló el experimento, al término del cual se determinó rendimiento total, número de nódulos, porcentaje de infección por MVA y N y P movilizado.

**Palabras claves:** trébol rosado, micorrizas VA, *Rhizobium trifolii*, roca fosfórica.

**LITERATURA CITADA**

ALLEN, O.N. and ALLEN, E.K. 1981. The leguminosae - A source book of characteristics, uses, and nodulation. Wisconsin, The University of Wisconsin Press. 812 p.

ANDRADE, G., BORIE, F., AZCÓN, R. and BAREA, J.M. 1996. *Macuna aterruna* a Tropical Legume Species Capable of Using Rock Phosphate by Root Exudation, is a Mycorrhizal Host. En: mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development. C. Azcón-Aguilar and J.M. Barea (De) EUR. p.: 288-291.

- ASIMI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V. and GIANINAZZI, S. 1980. Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between VAM and *Rhizobium* in soybeans. *Canadian Journal Botany* 58: 2.200-2.205.
- AZCÓN, R. and OCAMPO, J.A. 1981. Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New Phytologist* 87: 677-685.
- AZCÓN, R.; RUBIO, R. and BAREA, J.M. 1991. Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth, N<sub>2</sub>-fixation (<sup>15</sup>N) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytologist* 117: 399-404.
- BAREA, J.M. and AZCÓN G.-DE AGUILAR, C. 1983. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. *Advances in Agronomy* 36: 1-52.
- BERMUDEZ, M., AZCÓN, R., CASTRO, L. and BAREA, J.M. 1996. Micronutrient uptake by bean Plants Growing in an Ultisolic Soil of the Humid Tropic as Affected by Mycorrhizas, Soil Microbiota and Rock Phosphate Interactions. In: *Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development*. C. Azcón-Aguilar and J.M. Barea (De) EUR. p.: 619-622.
- BOLAN, N.S.; HEDLEY, M.J. and WHITE, R.E. 1990. Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures. *Plant and Soil* 134: 53-63.
- BORIE, F. and ZUNINO, H. 1983. Organic matter-phosphorus associations as a sink in P-fixation processes in allophanic soils of Chile. *Soil Biology and Biochemistry* 15: 599-603.
- BORIE, F.; QUINTEROS, J. y AGUILERA, M. 1983. Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. IV. Solubilización de fosfatos por hongos del suelo. *Agricultura Técnica (Chile)* 43(4): 371-376.
- BORIE, F.; MORALES, A. y PINO, M. 1992. Toxicidad de acidez y aluminio sobre plántulas de trébol rosado y trébol blanco, crecidos en solución nutritiva. *Agricultura Técnica (Chile)* 52: 134-138.
- BORIE, F.; ZUNINO, H. and MARTÍNEZ, L. 1989. Macromolecule-P associations and inositol phosphates in some chilean volcanic soils of temperate regions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 20: 1.881-1.894.
- CAMPILLO, R. y DEMANET, R. 1993. Evaluación agronómica de rocas fosfóricas en praderas naturalizadas de la IX Región. Primer Seminario Nacional sobre uso de rocas fosfóricas en Agricultura. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (Chile), Estación Experimental Carillanca (Temuco). Serie Carillanca Nº 29. p.: 211-238.
- CARDOSO, E.J.B.N. 1985. Efeito da micorriza vesículo-arbuscular e fosfato-de-rocha na simbiose soja-Rhizobium. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 9: 125-130.
- CARDOSO, E.J.B.N. 1986. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em soja com *Rhizobium japonicum* e fosfato de rocha, em função do tipo de solo. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 10: 17-23.
- CARDOSO, E.J.B.N. e LAMBAIS, M.R. 1992. Aplicações práticas de micorrizas vesículo-arbusculares (MVA). In: *Microbiologia do Solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p.: 281-296.
- DUNCAN, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.
- GIOVANNETTI, M. and MOSSE, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- HARDIE, K. and LEYTON, L. 1981. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphate deficient soils. *New Phytologist* 89: 599-608.
- HEWITT, E.J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2<sup>nd</sup> edition. London, Commonwealth Agricultural Bureau. 547 p.
- KUCEY, R.M.N.; JANSEN, H.H. and LEGGETT, 1989. Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *Advanced in Agronomy* 42: 199-228.
- MOSSE, B.; POWELL, C.D. and HAYMAN, D.S. 1976. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza and symbiotic nitrogen fixation. *New Phytologist* 76: 331-342.
- MOSSE, B. 1981. Vesicular-arbuscular mycorrhiza research for tropical agriculture. *Res. Bull. (Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources)* 194. p.: 81.
- MOSSE, B. 1987. The role of mycorrhiza in legume nutrition on marginal soils. In: J.M. Vincent, A.S. Whitney and J. Bose (ed.). *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. College of Agriculture. Miscellaneous Publication. p.: 275-295.
- MUNNS, D.N. and MOSSE, B. 1986. Mineral nutrition of legume crops. In: R.I. Summerfield and A.H. Bunting (ed.). *Advances in legume science*. Her Majesty's Stationery Office. London. p.: 115-125.
- PAIRUNAN, A.K.; ROBSON, A.D. and ABBOTT, L.K. 1980. The effectiveness of vesicular-arbuscular mycorrhizas in increasing growth and phosphorus uptake of subterranean clover from phosphorus sources of different solubilities. *New Phytologist* 84: 327-338.
- PHILLIPS, J.M. and HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of British Mycology Society* 55: 158-161.

- ROSS, J.P. and GILLIAN, J.M. 1973. Effect of Endogone mycorrhiza on phosphorus uptake by soybeans from inorganic phosphates. *Soil Science Society of American Proceedings* 37: 237-239.
- RUBIO, R., URIBE, R., BORIE, F., MORAGA, E. y CONTRERAS, A. 1994. Micorrizas VA en horticultura. Velocidad de infección en lechuga y tomate y su incidencia sobre el desarrollo del cultivo. *Agricultura Técnica* 54(1): 7-14.
- SAIF, S.R. 1986. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in tropical forage species as influenced by season, soil texture, fertilizers, host species and ecotypes. *Angew. Botanik* 60: 125-139.
- SHAPIRO, S.S. and WILK, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality. *Biometrics* 52: 591-611.
- SIEVERDING, E. and GALVEZ, A.L. 1988. Soil and phosphate sources affect performance of VA mycorrhizal fungi with cassava. *Angew. Botanik* 62: 283-293.
- SIQUEIRA, J.O. y FRANCO, A.A. 1988. Processos Microbiológicos e bioquímicos no solo. En: *Biotecnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas*. Editora Grafica Magy Ltda. Sao Paulo. 235 p.
- TARAFDAR, J.C. and MARSCHNER, H. 1994. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biology and Biochemistry* 26 (3): 387-395.
- URZÚA, H.; MUÑOZ, P. y BORIE, F. 1992. Infección natural por micorrizas VA en suelos de Osorno (X Región). *Ciencia e Investigación Agraria* 19 (3): 131-135.
- URZÚA, H., MUÑOZ, P. y BORIE, F. 1993. Efecto de micorrizas VA sobre la fijación de N en trébol blanco en suelos de la Zona Sur de Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 20(1): 447-54.