



Ministerio de Educación Superior  
Universidad de Guantánamo  
Facultad Agroforestal de Montaña



# *Trabajo De Diploma*

En opción al Título de Ingeniero Agrónomo



**Título:** Respuesta de la *Canavalia ensiformis* (L) D.C. ante la coinoculación de aislados de *Rhizobium* sp. y cepas de hongos micorrízicos arbusculares

**Autor:** Jorge Luis Verane Correa

“Año 56 de la Revolución”

Curso 2013- 2014



Ministerio de Educación Superior

Universidad de Guantánamo

Facultad Agroforestal de Montaña



# *Trabajo De Diploma*

En opción al Título de Ingeniero Agrónomo



**Título:** Respuesta de la *Canavalia ensiformis* (L) D.C. ante la coinoculación de aislados de *Rhizobium* sp. y cepas de hongos micorrízicos arbusculares

**Autor:** Jorge Luis Verane Correa

**Tutor:** Ing. Yonger Tamayo Aguilar. MSc

**“Año 56 de la Revolución”**

**Curso 2013- 2014**

## *PENSAMIENTO*

*...La agricultura es la única fuente constante,  
cierta y enteramente pura de riqueza...*

*José Martí*

## *AGRADECIMIENTOS*

- *Al claustro de profesores que me impartió clases durante el desarrollo de mi carrera.*
- *A mis padres por su apoyo incondicional durante el desarrollo de mi carrera.*
- *A mi tutor MSc. Yonger Tamayo Aguilar, el cual me brindó toda la ayuda posible en la realización de este trabajo.*
- *A todos mis familiares y demás personas que de una forma u otra influyeron en mi desarrollo como futuro profesional.*
- *A todos mis compañeros de aula por su preocupación durante la carrera y ayuda en la realización de este trabajo.*

## **DEDICATORIA**

- *Dedico este trabajo especialmente*
- *A mi madre Eloisa Correa Guzmán, por su apoyo incondicional en mi formación como profesional.*
- *A todas aquellas personas que de una forma u otra influyeron en mi formación para que mi sueño se hiciera realidad.*
- *A mí tutor MSc .Yonger Tamayo Aguilar por su ayuda, comprensión y entrega en la realización de este trabajo.*
- *A cada uno de mis amigos y compañeros de estudios los cuales me ayudaron y apoyaron durante la carrera y en especial en la realización de este trabajo.*

RESUMEN

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la respuesta de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. a la coinoculación de dos aislados de *Rhizobium* sp. provenientes de nódulos de *Canavalia* y dos cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado, se desarrolló la presente investigación en áreas del Polígono Docente de la Facultad Agroforestal de Montaña, ubicada en el municipio El Salvador, provincia Guantánamo, durante los meses abril - julio de 2012. Los tratamientos se distribuyeron en cuatro réplicas en un diseño experimental de bloques al azar con arreglo bifactorial, donde los factores de estudio fueron tres niveles del factor inoculación de *Rhizobium* sp. (aislados Can 2 y Can 5 más un tratamiento sin inoculación) y tres niveles del factor inoculación micorrízica (*Glomus cubense*, *Rhizophagus intraradices* y un testigo sin inoculación), para un total de nueve tratamientos. Para la selección de los mejores aislados de *Rhizobium* y cepas de HMA, se evaluó masa seca aérea, variables de la nodulación (nódulos totales, masa seca y efectividad de los nódulos) y variables fúngicas (colonización micorrízica, densidad visual y número de esporas). Los resultados mostraron que *Canavalia* tuvo respuesta a la coinoculación *Rhizobium* - HMA en las diferentes variables evaluadas, con mayor significación en la combinación de *Rhizobium* y *Rhizophagus intraradices*, destacándose la combinación del aislado Can 5 y la cepa de HMA *Rhizophagus intraradices* la cual incrementó los indicadores estudiados, manifestándose como las mejores cepas de estos microorganismos para la *Canavalia* en este tipo de suelo.

Palabras claves: *Canavalia*, *Rhizobium*, coinoculación, micorriza

# SUMMARY

## **SUMMARY**

With the objective of evaluating the answer of *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. to the isolated co inoculation of two of *Rhizobium* sp. coming from nodules of *Canavalia* and two vines of fungi micorryzhical arbuscular (HMA) in a Brown floor Fluffed Carbonated Sialitico, the present investigation was developed in areas of the Educational Polygon of the Teaching Polygon of the Agroforestry faculty of Mountain, located in the municipality El Salvador, county Guantánamo, during the months April - July of 2012. The treatments were distributed in four replies in an experimental blocks design at random with arrangement bifactorial, where the study factors were three levels of the factor inoculation of *Rhizobium* sp. (isolated Dog 2 and Dog 5 more a treatment without inoculation) and three levels of the factor inoculation micorryzhical (*Glomus cubense*, *Rhizophagus intraradices* and a witness without inoculation), for a total of nine treatments. For the isolated selection of the best of *Rhizobium* and vines of HMA, it was evaluated dry air mass, variables of the nodulation (total nodules, dry mass and funcionability of the nodules) and variable fungoid (colonization micorrizica, visual density and number of spores). The results showed that *Canavalia* had answer to the coinoculation *Rhizobium* - HMA in the evaluated different variables, with more significance in the combination of *Rhizobium* and *Rhizophagus intraradices*, standing out the combination of the isolated Dog 5 and the vines of HMA *Rhizophagus intraradices* which increased the studied indicators, showing as the best vines in these microorganisms for *Canavalia* in this soil type.

**Keywords:** *Canavalia*, *Rhizobium*, coinoculation, micorrizyhhical

INDIGEE

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1	Abonos verdes. Definición y funciones.....	4
2.1.1.	Cualidades que deben reunir los Abonos verdes.....	6
2.2.	Características generales de la especie <i>Canavalia ensiformis</i> .....	6
2.2.1.	Principales efectos de los abonos verdes sobre las características físicas, químicas y biológicas del suelo.....	9
2.2.2.	Producción de masa seca y contenido de nutrientes.....	10
2.3.	Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico .....	12
2.3.1.	Género <i>Rhizobium</i> .....	12
2.3.2.	Fijación de nitrógeno por las leguminosas .....	13
2.3.3.	Simbiosis <i>Rhizobium</i> – leguminosas .....	14
2.3.4.	Nodulación en leguminosas .....	15
2.4.	Importancia de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) .....	16
2.4.1.	Características y beneficios .....	17
2.4.2.	Simbiosis <i>Rhizobium</i> - HMA- leguminosas.....	18
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
3.1.	Condiciones experimentales .....	21
3.1.1.	Condiciones climáticas en el período evaluado .....	21
3.2.	Diseño experimental.....	22
3.3.	Métodos de inoculación de los biofertilizantes empleados.....	23
3.4.	Evaluaciones realizadas y metodologías empleadas .....	23
3.5.	Análisis estadístico .....	26
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
4.1.	Masa seca aérea de <i>Canavalia</i> a los 70 días después de germinada.....	27
4.2.	Nodulación de <i>Canavalia</i> a los 70 días después de germinada .....	31

4.3. Variables del funcionamiento fúngico.....	34
4.4. Número de esporas de HMA en la rizosfera de Canavalia a los 70 después de germinada.....	38
V. APORTE A LA DEFENSA .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
VI. CONCLUSIONES .....	42
VII. RECOMENDACIONES .....	43
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	

# INTRODUCCIÓN

## I. INTRODUCCIÓN

La aplicación continua de fertilizantes minerales ha propiciado numerosos desbalances en el biotopo, por lo cual resalta como actividad agrícola poco sostenible para la producción, además en Cuba, es un material importado, que por consiguiente encarece el proceso, es poco accesible y aplicados descontroladamente pueden contaminar las aguas y el medio ambiente en general.

Por otra parte, la fijación biológica del nitrógeno (FBN) es uno de los fenómenos de mayor importancia en la naturaleza, pues representa la utilización de un gas inerte como fuente para un grupo de microorganismos. Este elemento mineral fijado en el suelo puede ser utilizado directa o indirectamente por plantas de interés agrícola y forestal, a través de sus relaciones simbióticas con los microorganismos diazotróficos, constituyendo el mecanismo de compensación de las pérdidas del elemento en forma gaseosa por las acciones que ejercen las poblaciones microbianas (Jiménez y Peña, 2000).

Una forma sostenible de incorporar  $N_2$  a los sistemas agrícolas, es la inserción dentro de las rotaciones de cultivos y otras modalidades de siembra, plantas que establezcan simbiosis capaces de realizar la fijación biológica de nitrógeno. Entre estos tipos de planta se encuentran las leguminosas que se emplean como abonos verdes, que son capaces de mantener o mejorar las características físicas, químicas y biológicas del suelo, lo cual es importante desde el punto de vista de ahorro de fertilizantes nitrogenados y de la reducción de los costos de producciones (Martínez *et al.*, 2007).

En las condiciones de Cuba, *Canavalia ensiformis* se encuentra entre las plantas más empleadas como abono verde, la cual se destaca por establecer simbiosis con la familia *Rhizobiaceae* y así fijar grandes cantidades de N atmosférico que oscilan entre 150 a 200 kg N.ha<sup>-1</sup> y hasta 5 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca, lo que la ubica como una especie importante para el aporte de este nutriente al suelo, además de elevar sosteniblemente los rendimientos de cultivos tan diversos como maíz, papa, calabaza, malanga, entre otros (García *et al.*, 2002; Martin, 2009).

Al mismo tiempo, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), unidos con los rizobios son vías que permiten mejorar el desarrollo de los cultivos, cuando interactúan con las plantas creando simbiosis entre sí, los cuales están presentes en cerca del 95% de los cultivos agrícolas y pueden aumentar los procesos de absorción y traslocación de nutrientes en las plantas, además en las cercanías de la raíz los filamentos hifales son capaces de prospectar volúmenes de suelo mucho mayores que las raíces no micorrizadas, estimulando de esta forma el aprovechamiento de los fertilizantes minerales y los nutrientes del suelo por las plantas, dando lugar al incremento de la producción de biomasa aérea y radical (Sánchez, 2001); (Rivera y Fernández, 2003).

En la coinoculación tripartita HMA – *Rhizobium* – leguminosas, se ha reportado que las relaciones simbióticas proporcionan un mayor intercambio entre los simbioses y efectos superiores a las plantas. En este caso la simbiosis *Rhizobium* – leguminosas aporta N<sub>2</sub> y las micorrizas incrementan la absorción de otros elementos, entre ellos el P, muy importante para garantizar una adecuada fijación biológica de nitrógeno y crecimiento de las plantas (Rivera y Fernández, 2003). La doble inoculación *Rhizobium* – HMA produce mayor crecimiento, número, peso seco en los nódulos y mayores contenidos de P y N en la planta (Martín, 2009).

Bajos estos criterios se han desarrollado en las condiciones de Cuba, diferentes proyectos de investigación y prácticas con enfoques agroecológicos basados en el uso y manejo de los abonos verdes y biofertilizantes, para el mejoramiento de la fertilidad del suelo y la nutrición de las plantas. Desde el punto de vista productivo, la coinoculación de aislados de *Rhizobium* sp. y cepas de hongos micorrízicos arbusculares en *Canavalia ensiformis*, son puntos en los que habría que profundizar en la provincia de Guantánamo y más aún en el municipio El Salvador, donde no existen antecedentes de este tipo de estudio para esta especie vegetal. Sobre la base de lo que se expone y en aras de aprovechar los beneficios que nos brinda el empleo de esta práctica, formulamos el siguiente

**Problema científico:**

¿Cómo responden los aislados de *Rhizobium* sp. y cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) coinoculados en Canavalia para un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado?.

**Hipótesis**

La selección de un aislado de *Rhizobium* sp. y una cepa de HMA para Canavalia, permite incrementar el valor agronómico de esta especie en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado en el polígono docente de la facultad Agroforestal de Montaña.

**Objetivo general**

Evaluar la respuesta de Canavalia a la coinoculación de aislados de *Rhizobium* sp. y cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado.

**Objetivos específicos**

1. Valorar el efecto de la coinoculación *Rhizobium* – HMA- leguminosa en las variables de funcionamiento fúngico y las relacionadas con la nodulación de *Rhizobium* sp. en Canavalia.
2. Determinar el aislado de *Rhizobium* sp. y cepa de HMA más eficiente para Canavalia crecida en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado.
3. Evaluar la producción de masa seca aérea de Canavalia coinoculada con los aislados de *Rhizobium* sp. y cepas de HMA.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Abonos verdes. Definición y funciones.

La práctica de los abonos verdes en la agricultura, es el cultivo de especies vegetales nativas o introducidas, perennes o anuales, asociadas y en rotación, consistiendo en la incorporación de la masa vegetal no descompuesta, con la finalidad de proteger, recuperar y mejorar las condiciones biológicas, físicas y nutricionales de los suelos (Martín, 2009).

Al descomponerse, los abonos verdes dan lugar a una serie de reacciones bioquímicas que incrementan la actividad microbiana del suelo, fomentando una mayor cantidad y diversidad de microorganismos, que se encargan de la mineralización de los elementos nutritivos. También, cuando son incorporados al suelo, favorecen la actividad de los microorganismos como hongos y bacterias que descomponen la celulosa, las que a su vez refuerzan con sus secreciones la consistencia de los agregados del suelo, que son necesarios para el correcto equilibrio del agua y del aire en el suelo (Peoples *et al.*, 2004).

En los últimos años se ha ampliado la definición de abonos verdes/cultivos de cobertura (AV/CC), que se cultivan no sólo para ser incorporados, sino que además se siembran para promover la cobertura del suelo, protegiéndolo de la erosión, el impacto de la lluvia y para controlar el crecimiento de arvenses (Barrera, 2010).

Las plantas utilizadas como abonos verdes generalmente pertenecen a la familia de las leguminosas, por la posibilidad que tienen éstas de fijar nitrógeno atmosférico en asociación con bacterias del género *Rhizobium* (Keng, 1996, Lloyd, 1997), aunque en los últimos tiempos se cultivan otras especies de crecimiento rápido y de buena producción de masa verde, como es el caso de algunas gramíneas, crucíferas o compuestas (Álvarez *et al.*, 1995; Sociedad de agricultores de Chile, 2013).

Se han registrados múltiples beneficios de los abonos verdes/cultivos de cobertura los cuales están asociados a los siguientes puntos básicos:

- Estimulan de forma inmediata la actividad biológica y mejoran la estructura del suelo, por la acción mecánica de las raíces, por los exudados radicales, por la formación de sustancias prehúmicas al descomponerse y por la acción directa de las células microbianas y micelios de hongos, asegurando altas producciones en las cosechas y por ende a la generación de ingresos (Prager *et al.*, 2002).
- Reducen los costos de riego, mediante la cobertura que establecen unida a la actividad metabólica que se desarrolla en torno a ellos, al mismo tiempo protegen al suelo de la erosión y mejoran la circulación del agua en el mismo, factores que favorecen la reserva de agua en el suelo (Madero *et al.*, 2003; Shoko M. 2009).
- Aseguran la renovación del humus estable, acelerando su mineralización mediante el aporte de un humus más "joven" y más activo estimulando la actividad biológica del suelo, al suministrarse un sustrato para el desarrollo de los organismos (Sánchez de P., *et al.*, 2003; Dhima *et al.*, 2009).
- Evitan el desarrollo y competencia de las arvenses (Prager *et al.*, 2002; Vázquez y Álvarez, 2011).
- En su descomposición, se liberan o sintetizan sustancias orgánicas fisiológicamente activas, que tienen una acción favorable sobre el crecimiento de las plantas y su resistencia al parasitismo (Gallego *et al.*, 2010).
- Reducen la necesidad del uso de herbicidas y plaguicidas (Gómez, 2000).

En síntesis, los abonos verdes dan lugar a una serie de reacciones bioquímicas que incrementan la actividad microbiana del suelo, fomentando una mayor cantidad y diversidad de microorganismos, que se encarga de la mineralización de los elementos nutritivos. También, cuando son incorporados al suelo, favorecen la actividad de los microorganismos como hongos y bacterias que descomponen la celulosa, las que a su vez refuerzan con sus secreciones la

consistencia de los agregados del suelo, que son necesarios para el correcto equilibrio del agua y del aire en el suelo (Prager *et al.*, 2012).

### 2.1.1. Cualidades que deben reunir los Abonos verdes

- Producción de abundante biomasa aérea en períodos cortos de tiempo. Algo que normalmente no se menciona es la biomasa radical, la cual en algunos de estos abonos verdes contribuye a un efecto rizosférico que impacta disponibilidad de nutrientes (Sánchez de P. *et al.*, 2007).
- Su metabolismo fisiológico debe permitir que alcancen rápidamente la floración, etapa ideal para su incorporación (Prager *et al.*, 2002).
- Las especies que se emplean como abonos verdes deben ser competitivas con la flora acompañante y de fácil adaptación a las condiciones del medio.
- La condición herbácea, acompañada de bajas a medias relaciones C/N son ideales para favorecer una rápida incorporación al suelo y por lo tanto, disponibilidad de nutrientes.
- Los abonos verdes pueden aunar otras cualidades como por ejemplo albergadoras de insectos benéficos y/o efectos alelopáticos sobre arvenses (Martín, 2009). Por ejemplo, *Crotalaria juncea* ha sido registrada como especie albergadora de insectos que hacen control biológico, *Canavalia ensiformis* muestra efectos alelopáticos contra poblaciones de ácaros.

### 2.2. Características generales de la especie *Canavalia ensiformis*

Según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (2014) la *Canavalia* pertenece a la siguiente taxonomía:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Familia: *Fabaceae*

Sub - familia: *Faboideae*

Tribu: *Phaseolae*

Subtribu: *Diocleinae*

Género: *Canavalia*

Especie: *Canavalia ensiformis*

Nombre científico: *Canavalia ensiformis* (L.) D. C.

Nombre común: Frijol de puerco, frijol de machete, haba de caballo, poroto sable y poroto gigante.

Es una planta nativa de América, encontrada en estado silvestre en Las Antillas y zonas tropicales africanas y asiáticas. Es muy rústica, anual o bienal, de crecimiento determinado cuando se desarrolla en condiciones de abundante luminosidad e indeterminado bajo sombra, en ambas condiciones puede alcanzar una altura de 0.6 a 1 m (Embrapa, 2007).

Sus raíces son pivotantes; tallos poco ramificados, glabros, de color púrpura, hasta 10 m de largo, volviéndose duros en la madurez; hojas trifoliadas, folíolos grandes, ovados a elíptico-ovados, muy acuminados en el ápice, hasta 20 x 10 cm, glabros, verdes oscuros, brillantes, venas bien marcadas; inflorescencia colgante, hasta 30 cm de largo con 10-20 flores en abultamientos; flores grandes, 2,5 cm de largo, de color violáceo, rosado o blanco con base roja, cáliz tubuloso con los dientes muy desiguales, estandarte hasta 2.8 cm de largo, quilla recurvada hacia arriba; fruto hasta 30 x 3,5 cm, ensiforme, aplastado, algo recurvado, rostrado, con 2 o 3 costillas longitudinales cerca de la sutura superior, indehiscente; semillas 12-20, oblongas a redondas, algo aplastadas, 21 x 15 x 10 mm, lisas, blancas con un hilo largo de color café rodeado de una zona color castaño (Beyra *et al.*, 2004).

Se utiliza desde el punto de vista ecológico y económico debido a su elevada adaptabilidad a diversos ecosistemas y a su amplia utilización como suplemento nutritivo en la alimentación animal y humana, en la recuperación de los suelos, como abono verde, como cobertura por la gran cantidad de follaje que produce (neutralizando el surgimiento y desarrollo de los procesos de erosión) y como control de plagas y arvenses en la protección de cultivos (Torres *et al.*, 1995).

La utilización de la *Canavalia ensiformis*, como recurso alimenticio está limitada por la baja digestibilidad de sus proteínas y por la presencia de factores antinutricionales tales como la concanavalina, la canavanina y los taninos; sin embargo existen evidencias del efecto positivo de algunos tratamientos como el remojo, la cocción y el tostado en la reducción de estos factores y en el aumento de la digestibilidad proteica (Angulo *et al.*, 1986).

Según CIDICCO (2008); Espíndola *et al.* (1997) y Embrapa (2007) la *Canavalia* presenta un ciclo vegetativo que oscila entre 240 a 270 días, su germinación comienza a partir de los 2 a 3 días después de la siembra, se desarrolla con temperaturas de 15 – 30°C, precipitaciones de 640 – 4200 mm.año, altura geográfica de 0 – 1800 msnm, excelente tolerancia a la sequía, moderada a la inundación y buena a la sombra, alta sensibilidad al fotoperíodo y su tasa inicial de crecimiento es rápida. La masa en floración pueda alcanzar de 13,6 – 60 t.ha<sup>-1</sup> de masa fresca y de 2,5 – 8,4 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca, como mínimo, es capaz de fijar 49 kg N.ha<sup>-1</sup> derivado de la FBN y acumular en sus tejidos vegetales 57 kg N.ha<sup>-1</sup>. Para abono verde/cultivo de cobertura se siembra en surcos de 50 cm de distancia y 20 cm dentro del surco utilizando 150 - 180 kg.ha<sup>-1</sup> de semilla, asociado con cultivos, 4 plantas por m<sup>2</sup> (65 - 70 kg.ha<sup>-1</sup> de semilla), para producción de semillas se siembra en surcos de 1 m de distancia y 20 cm entre plantas (65 - 100 kg.ha<sup>-1</sup> de semilla), con profundidad de siembra entre 2 - 5 cm.

Se caracteriza por ser poco exigente en condiciones de productividad del suelo para lograr un óptimo desarrollo vegetativo. Tolerancia un amplio rango de textura y fertilidad, crece bien en suelos bajos, tropicales, altamente lixiviados, pobres en nutrientes y pedregosos, así como en suelos ácidos y salinos con un rango de pH entre 4,3 a 7,5.

En experiencias obtenidas en Cuba se ha demostrado que para las condiciones del país, la época de siembra óptima coincide en general con la más lluviosa y de días largos (mayo - octubre), en la cual se ha observado una abundante producción de cobertura y masa foliar. *Canavalia* produce en esta época como promedio 3,4 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca y 153 kg.ha<sup>-1</sup> de N. Lo que hace resaltar su empleo como abono verde (García, 1997; García *et al.*, 2002).

Sin embargo, en la época de invierno, que predominan temperaturas bajas, pocas precipitaciones y días cortos, el crecimiento y desarrollo de las leguminosas para abono verde es mucho más lento y la masa total obtenida es baja. *Canavalia* produce 0,84 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca y 54,9 kg.ha<sup>-1</sup> de N (García, 1997; Álvarez *et al.*, 1995).

Según Borges (2009), las leguminosas pueden emplearse asociadas, intercaladas y en rotación con diferentes cultivos de interés agrícola.

En Cuba, con relación a las especies de leguminosas asociadas y en rotación con otros cultivos, los resultados experimentales han demostrado que los géneros *Mucuna*, *Dolichos*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria* son las más promisorias para su utilización, cuando se realiza un manejo apropiado y se observan sus peculiaridades. No obstante, diferentes autores (Zea, 1993) coinciden en que *Canavalia* posee características sobresalientes para la siembra intercalada con maíz, debido a sus hábitos de crecimiento y a sus características morfológicas.

### **2.2.1. Principales efectos de los abonos verdes sobre las características físicas, químicas y biológicas del suelo**

- Las características físicas más influenciadas por los abonos verdes son: agregación, capacidad de retención del agua, densidad, velocidad de infiltración y aireación (Keng, 1996). Por otra parte influyen además en la temperatura, mejoran la estructura, la textura y facilitan la penetración de capas endurecidas con raíces profundas (Astier *et al.*, 2006; Correa, 2010).
- Protegen la capa superficial del suelo contra el impacto de las gotas de lluvia y el viento, disminuye la evaporación del suelo, favorecen la aireación y estructuración del suelo por efecto del sistema radical, del proceso de transformación de la materia orgánica y de los microorganismos asociados a las raíces de los abonos verdes, entre ellos los HMA (Mosavi *et al.*, 2009).
- Los abonos verdes al elevar los contenidos de materiales orgánicos en el suelo estimulan la actividad biológica de estos, debido a que

aportan un material orgánico para el suelo determinante en la actividad de los microorganismos, constituyendo una fuente de energía para el desarrollo de poblaciones de bacterias fijadoras de  $N_2$ , tanto de vida libre como simbióticas, las poblaciones de microorganismos que aportan sus contenidos enzimáticos para que estos materiales sean digeridos y mineralizados e incrementen el contenido nutricional del suelo (CIDICCO, 2008).

- Según Prager *et al.* (2002), los abonos verdes incorporados en el campo en estado de prefloración se convierten en masa rápidamente ciclada por los organismos del suelo, lo cual asegura disponibilidad temprana de nutrientes al cultivo establecido en asocio o rotación. Se aprovechan las fuentes de N provenientes de la mineralización y de la fijación biológica de  $N_2$  (Gómez, 2000; Sánchez de P *et al.*, 2007; CIDICCO, 2008).
- Incrementa la masa microbiana capaz de fijar nitrógeno atmosférico, siendo este último mayor o menor, en dependencia de factores como la cualidad de la bacteria, tipo de leguminosa y las condiciones generales de suelo, contribuyendo al desarrollo y actividad de la micro y macrovida del mismo, manteniendo de esta forma un equilibrio biológico (Hernández *et al.*, 2012a).
- Incrementan la calidad del suelo, mejoran la capacidad de intercambio catiónico (CIC), aumentan los contenidos de materia orgánica, mejoran el retorno de N a través de la fijación biológica de  $N_2$ , disminuyen el lavado de nutrientes, pueden incrementar el pH, la acumulación del C orgánico y la mineralización del N y P orgánico, pudiendo complementar o sustituir fertilizantes de síntesis industrial (Prager *et al.*, 2002; Lavelle, 2012).

### **2.2.2. Producción de masa seca y contenido de nutrientes**

La selección de una especie de planta para ser utilizada como abono verde depende en gran medida de su tasa de crecimiento (Álvarez, 2000). Los abonos verdes deben ser rústicos, de crecimiento rápido y alta producción de

biomasa, esto último depende de las condiciones edafoclimáticas y fitosanitarias (Filho *et al.*, 2004).

En Cuba se demostró que la época de siembra óptima coincide con la más lluviosa y de días largos (mayo – octubre), factores que favorecen un incremento vegetativo exuberante en cortos períodos de tiempo y en la cual se ha observado un abundante crecimiento de las plantas, con promedios que oscilaron entre 3 – 11 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca y aportes entre 150 – 250 kg N.ha<sup>-1</sup>, en dependencia de las especies empleadas (García, 1997). En el período poco lluvioso, con días cortos y temperaturas bajas, el crecimiento y desarrollo de las plantas es mucho más lento y la biomasa total obtenida es baja, con promedios entre 0.8 – 1.8 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca y aportes de N entre 25 – 50 kg.N.ha<sup>-1</sup> (García, 1997; Espíndola *et al.*, 1997).

Los abonos verdes en el verano crecen más rápido y acumulan más N, debido a la intensidad de la luz solar (Cherr *et al.*, 2006). Al aumentar las precipitaciones, se intensifica el crecimiento de estas plantas (Filho *et al.*, 2004) y a mayor producción de fitomasa, se incrementa el contenido de nutrientes (Perin *et al.*, 2004). Las especies promisorias utilizadas como abono verde deben aportar cantidades de fitomasa seca y N iguales o superiores a 5 t.ha<sup>-1</sup> y 100 kg.N.ha<sup>-1</sup> respectivamente, para que tengan un impacto positivo sobre los cultivos y algunas propiedades del suelo (García, 1997).

Se ha corroborado por diferentes autores y en regiones de estudio, que los aportes mensuales de estas especies más bajos se han sido observado en los meses de octubre, noviembre y diciembre, existiendo ligeros incrementos en el aporte de masa seca y contenido de N en los restantes meses invernales, aunque sin llegar a los grandes aportes de los meses del verano (Álvarez, 2000; Filho *et al.*, 2004 ).

Por tanto, en el período de invierno predominan temperaturas bajas, pocas precipitaciones y días cortos, condiciones que hacen que las plantas florezcan en períodos relativamente cortos sin haber alcanzado el crecimiento vegetativo necesario, por lo que los aportes en materia seca y nutrientes en esta época

son pobres en comparación con los obtenidos en las condiciones de primavera - verano (Álvarez *et al.* 1995).

En sentido general, las especies utilizadas como abonos verde deben estar adaptadas a las condiciones del medio y a época del año, para que en el momento de su incorporación al menos alcance 2 t.ha<sup>-1</sup> de fitomasa seca y/o 40 kg N. ha<sup>-1</sup>, por su parte, las especies promisorias deben aportar cantidades de fitomasa seca y de nitrógeno iguales o superiores a 5 t.ha<sup>-1</sup> y/o 100 kg.ha<sup>-1</sup> respectivamente (García, 1997).

### **2.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico**

Los microorganismos capaces de establecer simbiosis con leguminosas se conocen con el nombre de rizobia o rizobios y engloban actualmente a una gran variedad de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. El conocimiento de la existencia de estos microorganismos data de finales del siglo XIX cuando, por primera vez, Frank en 1889 denominó *Rhizobium leguminosarum* a las bacterias aisladas a partir de nódulos de leguminosas. Fue este nombre el que dio origen al nombre genérico de rizobia para designar a todas las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. No obstante, aunque algunos autores consideran rizobia a todas aquellas bacterias capaces de nodular y fijar nitrógeno como son los casos de los géneros (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradhyrizobium*, *Azorhizobium* entre otros (Moulin *et al.*, 2001).

#### **2.3.1. Género *Rhizobium***

Las bacterias "*Rhizobium*" comúnmente conocidas como "Rizobios" no solamente se encuentran en la rizósfera (zona de raíces de las leguminosas) sino también como habitantes naturales del suelo, representando del 0.1 al 8% del total de las bacterias en el mismo y hasta un 0.14% de su biomasa (Graham *et al.*, 1998).

Los rizobios son bacterias (bacilos) Gram negativo, de 0.5 a 0.9 µm de ancho y 1.2 a 3.0 µm de largo, que no forman endosporas, de vida libre, aerobias y anaerobias facultativas. Subsisten en el suelo como heterótrofos saprofitos cuando no están infectando a un huésped. Dependiendo de la estación, el historial de cultivos y las prácticas de tratamiento agrícola, puede haber entre 10

y 106 rizobios por gramo de suelo, son bacterias móviles, con un flagelo polar único o bien de 2 a 6 flagelos peritricos. Generalmente este género vive saprofiticamente en el suelo, utilizando fuentes de energía y sustancias nitrogenadas del medio (Giongo *et al.*, 1996).

Las características más sobresalientes de los rizobios, es su capacidad de establecer una asociación endosimbiótica (intracelular) con miembros de la gran familia de plantas de leguminosas cuyo resultado es la formación de nódulos, donde se realiza la fijación de nitrógeno. Graham *et al.* (1998) indica que la información genética de la fijación de N está presente en los rizobios de vida libre y que la expresión de esta información es altamente afectada durante la simbiosis por la especificidad hospedante-cepas, además Freire (1996), manifiesta que algunas leguminosas tales como la soya, trébol y alfalfa son extremadamente exigentes o específicas respecto a su rizobio, mientras que otras son promiscuas, es decir, que pueden ser infectadas por un amplio rango de cepas de bacterias originalmente adaptadas a otras especies.

Las bacterias del género *Rhizobium* son habitantes naturales del suelo, aunque su población depende de diversos factores como el pH, temperatura, humedad y las fuentes de energía (Jiménez y Peña, 2000). La rizosfera de las leguminosas estimula la proliferación de géneros de *Rhizobium*, debido a que estos encuentran allí el ambiente más favorable que en el resto del suelo (Espíndola *et al.*, 1997; Biederbeck *et al.*, 2005).

### **2.3.2. Fijación de nitrógeno por las leguminosas**

La fijación biológica del Nitrógeno (FBN), constituye uno de los componentes primordiales de la sustentabilidad agrícola. La misma es realizada generalmente por bacterias y algas verdes - azules (*Cyanophyceae*) y se manifiesta en diversos procesos, tanto simbióticos como no simbióticos. Dentro del grupo de estos microorganismos, se encuentran las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, principalmente los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, las cuales infectan y nodulan las raíces de las plantas y dentro de los microorganismos de vida libre que establecen fijación no simbiótica del N se

encuentran las bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Clostridium* y otras (Mayea et al., 1991; Bauer, 2001).

Se debe considerar la especificidad biológica que se manifiesta cuando el hospedero y el macrosimbionte interactúan con algún grado de selectividad para dar lugar a la infección nodular y a la FBN, por lo que es necesario que en la rizosfera de la planta se encuentre la cepa de *Rhizobium* efectiva para la leguminosa (García, 2000b).

Un requerimiento importante para la fijación de N<sub>2</sub> de forma asociativa en las leguminosas es la presencia de P asimilable, debido a que tiene un efecto fundamental en el intercambio del carbono, en la multiplicación de las bacterias y en el mismo proceso de fijación. El K también es necesario, pero en cantidades relativamente más pequeñas que el P, e incluso es suficientemente conocido que altas dosis del elemento impiden el desarrollo de las bacterias fijadoras. La falta de molibdeno (Mo), hierro (Fe), manganeso (Mn), boro (B), cobalto (Co) y calcio (Ca) es crítica y puede inhibir la capacidad de fijación. La presencia de amonio puede inhibir la fijación debido a que los microorganismos utilizan preferiblemente el N mineral en lugar del N<sub>2</sub> de la atmósfera (Martínez et al., 2007).

### **2.3.3. Simbiosis *Rhizobium* – leguminosas**

Entre los distintos sistemas biológicos que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>), se destaca la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, que es el resultado de una interacción muy específica entre la bacteria y la planta, contribuyendo con el mayor aporte del elemento al ecosistema y a la producción de alimentos y se calcula que alcanza 20 % de la cantidad total del N fijada anualmente sobre el planeta (Martínez - Viera y Dibut, 2012).

La asociación mutualista de *Rhizobium* y leguminosas ha sido desde siempre la más estudiada por la importancia agronómica, económica y social que tiene el cultivo de estas plantas a escala mundial. Ambos participantes son capaces de vivir independientemente, sin embargo, los dos se benefician mutuamente de la interacción que se caracteriza por la formación de nódulos fijadores de nitrógeno que, en la mayoría de las leguminosas, se forman en la raíz. Los nódulos son

órganos especializados que se desarrollan como resultado de un diálogo molecular por parte de los rhizobia y de las plantas (Gibson *et al.*, 2008).

En consecuencia, con estudios que sean realizado en el mundo, se conoce que la contribución de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) al suministro de N a las plantas cultivadas depende de la eficiencia de la asociación y de la disponibilidad del elemento en el suelo cuando los factores ambientales son adecuados, elementos que disminuyen en gran medida la capacidad de fijación (Olivares, 2006).

#### **2.3.4. Nodulación en leguminosas**

La formación de los nódulos en las raíces de las leguminosas, es una de las etapas de fundamental importancia en el proceso de fijación biológica de nitrógeno debido a la perfecta relación de simbiosis que puede existir entre la planta (leguminosa) y las bacterias de los diferentes géneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* entre otros), que consiste en que el microorganismo entrega a la planta nitrógeno en forma asimilable para la misma, y a su vez, la planta suministra las sustancias nutritivas que necesita las especies de *Rhizobium* para cumplir sus funciones vitales (Martínez *et al.*, 2007).

Por otro lado, los nódulos radicales de las leguminosas son estructuras complejas, como ponen de manifiesto los estudios histológicos y fisiológicos, cuyo desarrollo y funcionamiento están regulados principalmente por la planta, la cual controla el número de nódulos mediante un mecanismo endógeno de retroinhibición o inhibición *feedback* y que se ha llamado de autorregulación, este mecanismo consiste en que, iniciado un número crítico de primordios nodulares, se bloquea la división celular en el córtex radical inhibiéndose el desarrollo de nuevos nódulos (Fernández, 2008).

En dependencia del sistema simbiótico se pueden encontrar dos tipos de nódulos: determinados o indeterminados, dado por el lugar en donde se induzcan las divisiones mitóticas en la raíz. Si se originan en el córtex interno dan inicio a los nódulos indeterminados y si lo hacen en el córtex externo son nódulos determinados.

En los nódulos determinados la actividad meristemática cesa temprano en su formación y su aspecto final resulta del alargamiento de las células, este tipo de desarrollo origina nódulos esféricos o globosos en algunas especies de leguminosas (*Vigna unguiculata*, *Desmodium canum* y *Centrosema brasilianum*), otros pueden organizarse alrededor de la raíz para formar los denominados nódulos en collar, peculiar de la *Canavalia* (Hirsch, 1992; Mayz, 2004).

Los nódulos indeterminados presentan un meristema persistente, que puede producir nódulos ramificados o coraloides, puesto que constantemente se añaden nuevas células a la parte distal del nódulo; de tal manera que todos los estados de desarrollo están así representados, debido a que ocurre un gradiente de formación desde la parte distal, a la proximal en el punto de unión a la raíz. Este tipo de desarrollo da lugar a nódulos elongados o cilíndricos (*Indigofera hirsuta*, *Cajanus cajan*, *Crotalaria retusa*) y ramificados o coraloides (*Crotalaria retusa*, *Gliricidia sepium*) (Hirsch, 1992; Mayz, 2004).

El color interno de los nódulos varía desde rojo hasta blanco y constituye una característica utilizada para medir la efectividad de la fijación. Cuando la simbiosis funciona con efectividad, tienen una coloración de rosada a roja debido a la presencia del pigmento leghemoglobina, cuya función consiste en regular los niveles de O<sub>2</sub> y aportar este elemento a las bacterias. Los nódulos de color claro indican en general poca o ninguna eficiencia en la fijación de N<sub>2</sub> (Martínez *et al.*, 2007).

En sentido general, la selección de rizobios nativos adaptados a las condiciones edafoclimáticas de Cuba, garantizarían el establecimiento exitoso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, generando un incremento en los rendimientos agrícolas, así como una reducción del empleo de fertilizantes nitrogenados (Hernández *et al.*, 2012b).

#### **2.4. Importancia de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA)**

El vocablo micorríza, proviene del griego *mykos*=hongo y *rhiza*=raíz, que literalmente significa hongo de la raíz, este término lo utilizó por vez primera el botánico de origen alemán Albert Bernard Frank, en 1885, para describir la

unión de dos organismos que forman un solo órgano morfológico, en el cual existe una retroalimentación de los simbioses (Agarwal y Sah, 2009).

Han sido uno de los microorganismos más estudiados debido a las asociaciones simbióticas mutualistas existentes entre ciertos hongos del suelo y las raíces de las plantas superiores, los hongos se benefician con el suministro de fuentes carbonadas provenientes de la planta y ésta se beneficia por la mayor exploración del suelo, lo que aumenta la capacidad de absorción de agua, nutrientes minerales y el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sánchez, 2001).

Las mismas están consideradas, según Barea *et al.* (1991); Madigan *et al.* (2004); Escobar *et al.* (2007) y Fernández (2012) simbioses universales, debido a que están presentes de manera natural, aproximadamente en el 85 % de las especies vegetales con interés agronómico.

#### **2.4.1. Características y beneficios**

Entre las funciones y beneficios que las micorrizas le brindan a las plantas están el incremento de la capacidad de absorción de agua y nutrientes, por lo que ayudan al hospedante a resistir mejor las condiciones adversas de suelo y clima, favorecen el aumento de la biomasa y producción de los cultivos y contribuyen a la formación de agregados estables en el suelo (Espíndola *et al.*, 1998; Filho, 2004).

Se han definido tres tipos de asociaciones micorrízicas, al tomar en consideración sus características morfoanatómicas y ultraestructurales: ectomicorrizas, que se caracterizan por desarrollar una espesa capa de micelio sobre la zona cortical de las raíces absorbentes de las plantas, ectendomicorrizas, que presentan manto externo, como las ectomicorrizas y penetran en el interior de las células, como las endomicorrizas, pero no existen vesículas ni arbuscúlos y endomicorrizas, caracterizadas por la colonización intracelular del hongo en el córtex radical (Read, 1998).

Las endomicorrizas no son detectadas visiblemente, forman una red externa de hifas y penetran el interior de las células corticales sin llegar a colonizar el endoderma. Es el grupo más difundido en el planeta y se divide en varios

subtipos, de los cuales el más representativo es el arbuscular, caracterizado por formar arbusculos intracelulares y es sin duda el de mayor difusión e importancia económica y ecológica (Duchicela, 2001; Martín, 2009).

Dentro de los HMA, los géneros *Rhizophagus* y *Glomus* se incluyen en la familia *Glomeraceae* que pertenecen al orden *Glomerales* pertenecientes al *Phylum Glomeromycota* que se caracterizan por formar filamentos llamados hifas (Schüßler y Walter, 2011; Rodríguez *et al.*, 2011).

La propagación de los HMA se da a través de esporas, micelio y fragmentos de raíces colonizadas, que de manera conjunta constituyen los propágulos y colonizan las raíces de las plantas hospedantes para desarrollarse y dar origen a nuevos propágulos (Souza *et al.*, 2007). La mayor cantidad de propágulos en el suelo se encuentra en los primeros 15 – 20 cm de profundidad, en relación directa con la aireación y contenido de materia orgánica (Peña *et al.*, 2006).

En términos generales se puede resumir que los beneficios de los HMA en la nutrición de las plantas son:

- Incrementan el abastecimiento de nutrientes por el aumento en el volumen de suelo explorado y la adquisición de fuentes de nutrientes que normalmente no son disponibles para las plantas (Augé, 2001).
- Fuente de inóculo que favorece la colonización de raíces por los HMA, mejorando la protección frente a hongos o nematodos parásitos (Correa, 2010).
- Los beneficios pueden incluir conservación del suelo pues los agregados de mayores dimensiones formados por las hifas micorrízicas, mejoran la capacidad de retención de agua (Sánchez de P y Gómez, 2003).
- Cambios favorables en el crecimiento, en la arquitectura de la planta, el tejido vascular y otros (Miller *et al.*, 1995; Sánchez de P *et al.*, 2007).

#### **2.4.2. Simbiosis *Rhizobium* - HMA- leguminosas**

La simbiosis *Rhizobium* - HMA-leguminosa es de gran interés agronómico debido a que ambos simbiosiontes cubren gran parte de los requerimientos de N y P que necesita la planta, mejoran el desarrollo de los nódulos y la fijación de nitrógeno, e incrementan el rendimiento de los cultivos y la eficiencia en el uso

de los fertilizantes. También al incrementarse la absorción de fósforo por la micorriza, se mejora el desarrollo radical y el crecimiento de la planta y se acelera la maduración de las cosechas. Estas simbiosis son útiles para las leguminosas, cuyo requerimiento de fósforo es importante, ya que la micorriza le suministra el fósforo necesario para el desarrollo de las plantas y la fijación biológica (Rivera y Fernández, 2003; Fernández, 2012).

La fijación de  $N_2$  es un proceso que requiere una alta demanda de P, por lo cual, el principal beneficio de la asociación con micorrizas arbusculares en las leguminosas es el P que el hongo suministra a la planta. Por otro parte el hongo requiere de una alta cantidad de nitrógeno para la síntesis de quitina, que es uno de los principales constituyentes de sus paredes.

Desde el punto de vista del gasto de energía, Baca *et al.* (2000) señalan que la fijación de un mol de  $N_2$  es muy costosa y que por cada mol de  $N_2$  fijado se gastan aproximadamente 18 moléculas de ATP, del cual el P juega un papel fundamental en este proceso.

De allí el gran beneficio de la doble simbiosis para las leguminosas, micorriza-rizobios, esta duplicidad simbiótica no solo beneficia a la planta y sino que a su vez existe una interrelación mutualista indirecta entre ambos microorganismos, por una parte el gran gasto energético se produce por la FBN, es compensado con el aumento de la captación de P por parte de las micorrizas. (Barea *et al.*, 2002), entre otros, encontraron mejores valores en la fijación biológica cuando estaban asociadas con micorrizas.

Diversos estudios realizados con la coinoculación *Rhizobium*-HMA-leguminosas han confirmado que se incrementa la nodulación y el crecimiento de las plantas y que la masa seca y los contenidos de N y P son mayores en las plantas micorrizadas (Filho, 2004).

Por su parte Federico *et al.* (2013), informaron que las asociaciones de *Rhizobium*-micorrizas arbusculares actúan sinérgicamente en los niveles de colonización, nutrición mineral y crecimiento de las plantas.

Los mismos autores, al experimentar con una cepa de *G. intraradices* que recientemente se reclasificaron taxonómicamente por Schüßler y Walker (2011) como *Rhizophagus intraradices* y una cepa de *Sinorhizobium meliloti* sobre la

leguminosa alfalfa (*Medicago sativa*), señalaron que la técnica de tinción de raíces con azul de Tripán reveló un elevado porcentaje de colonización fúngica y una presencia muy importante de vesículas, resultando evidente la presencia de apresorios, puntos de entrada de la hifa fúngica en la raíz, además en el interior de los nódulos se observó un número importante de esporas y los puntos de entrada del micelio externo en el nódulo.

En estudios recientes por Reyes (2013), informó que en dos períodos de siembra, *Canavalia* tuvo respuesta positiva a la coinoculación de diferentes aislados de *Rhizobium* y cepas de hongos micorrízicos arbusculares en suelos Ferralítico Rojo y Nodular Gley Ferruginoso al incrementarse todos los indicadores evaluados con respecto a los tratamientos sin coinoculación de estos microorganismos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Condiciones experimentales

Para alcanzar los objetivos propuestos se llevó a cabo un experimento de campo en el polígono docente de la Facultad Agroforestal de Montaña situado, en el km 6 ½, carretera Guantánamo - El Salvador, perteneciente a la Universidad de Guantánamo, en el período lluvioso (abril a julio de 2012) que coincide con la época de (primavera), sobre un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado (MINAG, 1999). Las características químicas principales del suelo se observan en la tabla. 1.

El pH fue ligeramente ácido. El suelo presentó contenido medio atendiendo a los valores de materia orgánica (MO). Los demás valores químicos están en correspondencia al tipo de suelo. Todas las evaluaciones se hicieron según las tablas de interpretación de análisis de suelo (Paneque y Calaña, 2001).

Tabla 1. Algunas características químicas de la capa arable del suelo al inicio del experimento (0 - 20 cm de profundidad).

pH H <sub>2</sub> O	MO (%)	P (mg.kg <sup>-1</sup> )	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>+</sup>
6,8	2,83	9,7	(cmol. kg <sup>-1</sup> )			
			0,05	0,11	15,0	6,0

Determinaciones químicas:

pH H<sub>2</sub>O potenciómetro: relación suelo/solución de 1:2,5; MO (materia orgánica) Walkley Black, P: solución 0.1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con relación suelo-solución 1: 2,5 según Paneque *et al.*, (2010).

##### 3.1.1. Condiciones climáticas en el período evaluado

La Tabla 2 describe los datos climáticos durante el período experimental desde abril hasta julio del 2012 (período lluvioso), tomados en la base de datos del INSMET (2012), valores registrados para la zona en estudio. Se observa que en este período, las variables climatológicas fueron favorables para el desarrollo del cultivo, destacándose en este sentido las precipitaciones que pudieron influir de forma positiva los resultados obtenidos, valores que están en correspondencia con la media histórica de la zona.

**Tabla 2.** Comportamiento de las variables meteorológicas (Abril - Julio 2012) en el período lluvioso.

Mes	T. Media. (°C)	H. Relativa. (%)	Precipitaciones (mm)
Abril	26,2	69	164,4
Mayo	27,5	73	190,8
Junio	27,9	78	106,9
Julio	27,9	77	111,6

Temperatura media (T. Media); Humedad relativa (H. Relativa). Datos procedentes de la base de datos INSMET (2012).

### 3.2. Diseño experimental

Se empleó un diseño de bloques al azar con arreglo bifactorial y tres réplicas. Se estudiaron tres niveles del factor inoculación de *Rhizobium* sp. (dos aislados de *Rhizobium* sp. más un tratamiento sin inoculación) y tres niveles del factor inoculación micorrízica (dos cepas y un testigo sin inoculación), para un total de nueve tratamientos que a continuación se relacionan.

- T<sub>1</sub> Canavalia sin rhiz sin HMA
- T<sub>2</sub> Canavalia Cepa rhiz 2
- T<sub>3</sub> Canavalia Cepa rhiz 2 + *G. cubense*
- T<sub>4</sub> Canavalia + *G. cubense*
- T<sub>5</sub> Canavalia Cepa rhiz 3
- T<sub>6</sub> Canavalia Cepa rhiz 3 + *G. cubense*
- T<sub>7</sub> Canavalia + *R. intraradices*
- T<sub>8</sub> Canavalia Cepa rhiz 2 + *R. intraradices*
- T<sub>9</sub> Canavalia Cepa rhiz 3 + *R. intraradices*

Se utilizó un área de 0,11 ha, distribuidas en 27 parcelas, cada parcela experimental contó con cuatro surcos a una distancia de 0,70 m de camellón por 4 m de largo para un área de 11.2 m<sup>2</sup>. La Canavalia se sembró de forma manual, a dos semillas por nido, a una distancia de norigón de 0,30 m. Las atenciones culturales se hicieron según recomendaciones de Martín (2009). Para la toma de las muestras se seleccionaron, en el área de cálculo (dos surcos centrales), tres plantas completas por metro lineal, incluyendo el suelo

de la rizosfera y las raicillas de las plantas, por cada tratamiento y réplica, dejando los dos surcos externos como área de borde, a los 70 días después de la germinación.

### 3.3. Métodos de inoculación de los biofertilizantes empleados

Como biofertilizantes sólidos: se utilizó las cepas *Glomus cubense*, (INCAM- 4) Y. Rodr. y Dalpé (Rodríguez *et al.*, 2011), conocida anteriormente como *Glomus hoi-like* y *Glomus intraradices* Smith y Schenck, (INCAM- 11), que recientemente se reclasificó taxonómicamente por Schüßler y Walker (2011) como *Rhizophagus intraradices* que se producen a escala comercial (EcoMic<sup>®</sup>), procedentes de la colección de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), productos de calidad mínima garantizada, 20 esporas por gramo de inoculante y 50 % de colonización radical, no tóxico y libre de patógenos. Como inoculante bacteriano se utilizaron dos aislados de *Rhizobium* (Can 2 y Can 5 con una concentración de  $10^7$  a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>), proveniente de nódulos de Canavalia pertenecientes a la colección de cepas de rizobios del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), aisladas por Hernández *et al.*, (2012a).

La coinoculación de estos biofertilizantes se realizó en el momento de la siembra, por el método de recubrimiento de las semillas según Fernández *et al.* (2000), se utilizó una dosis de 5.95 kg.ha<sup>-1</sup> de EcoMic<sup>®</sup>, equivalente al 10 % del peso de las semillas y 100 g de cada inoculante bacteriano. Primeramente se hizo una pasta homogénea, en una proporción de 1 kg de EcoMic<sup>®</sup> por cada 10 kg de semilla con las cepas de HMA separadas y posteriormente se les añadió cada aislado de *Rhizobium*. Para la inoculación simple del inóculo bacteriano se realizó mediante una solución azucarada, luego se recubrió la semilla hasta quedar cubierta completamente, se pusieron a secar en la sombra durante 5 a 10 minutos y posteriormente se procedió a la siembra.

### 3.4. Evaluaciones realizadas y metodologías empleadas

#### ✓ Análisis químico de suelo

Para determinar las propiedades químicas del suelo: pH, MO, P, Ca, K, Na y Mg, se utilizaron muestras compuestas tomadas entre 0 y 20 cm de profundidad, al inicio del experimento en forma de zigzag a lo largo y ancho del área experimental. El análisis se realizó en el Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Se utilizaron los métodos establecidos por Paneque *et al.* (2010), consistentes en: pH H<sub>2</sub>O por el método potenciométrico, con relación suelo: solución de 1:2,5. Materia orgánica del suelo por el método colorimétrico de Walkley y Black. P asimilable (mg.kg<sup>-1</sup>) por extracción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1N con relación suelo: solución 1:2,5. Cationes intercambiables (cmol.kg<sup>-1</sup>), por extracción con NH<sub>4</sub>Ac 1 Mol.L<sup>-1</sup> a pH 7 y determinación por complejometría (Ca y Mg) y fotometría de llama (Na y K).

✓ **Masa seca aérea**

Para determinar la masa seca aérea (t.ha<sup>-1</sup>), se tomaron los órganos de la parte aérea de las plantas (hojas y tallos) muestreadas. Se pesó cada órgano (g por planta) en conjunto y luego por separado en una balanza Sartorius digital METTLER, de ahí, se tomó una fracción de 100 gramos y se puso a secar en la estufa a 70 °C hasta alcanzar masa constante, determinándose la masa seca de cada órgano y se expresó en t.ha<sup>-1</sup>.

✓ **Evaluación de la nodulación por *Rhizobium***

- **Número de nódulos totales (u):** se procedió al conteo visual de la cantidad de nódulos presentes en la raíz de las plantas muestreadas.
- **Funcionabilidad (%):** Mediante un corte transversal, se determinó los nódulos funcionales, seleccionando los de color rojo - rosado presentes en las raíces de las plantas.
- **Masa seca de los nódulos totales (g. planta<sup>-1</sup>):** se determinó a través de una balanza digital.

### ✓ Colonización radical

Las raicillas muestreadas se lavaron con agua corriente, para eliminar todo el suelo y se secaron al aire. Se tomaron las raicillas más finas y se desmenuzaron. Para las determinaciones se pesaron aproximadamente 200 mg de raicillas que fueron secadas a 70°C, para ser teñidas según la metodología descrita por Phillips y Hayman, (1970). La evaluación se realizó por el método de los interceptos, desarrollado por Giovanetti y Mosse, (1980), mediante el cual se determinó el porcentaje de colonización micorrízica o frecuencia de colonización.

### ✓ Densidad Visual

La determinación del porcentaje de Densidad Visual (% DV) se realizó por la metodología de Trouvelot *et al.* (1986), mediante la cual se evaluó la ocupación fúngica de cada intercepto y se le asignó un nivel (Tabla 6). Posteriormente se realizó el cálculo según la fórmula:

$$\% DV = \Sigma A / \Sigma Z$$

Donde: Z es el número de interceptos contados en cada nivel y A es el resultado de la multiplicación del número de interceptos contados en cada nivel (Z), por el porcentaje de ocupación observada.

**Tabla 3.** Transformación de los porcentajes de ocupación fúngica intrarradical en niveles, según Trouvelot *et al.* (1986).

Nivel de evaluación	% de ocupación observada
0	0
1	1
2	2,5
3	15,5
4	35,5
5	47,5

✓ **Conteo de esporas de hongos micorrizícos arbusculares**

El conteo de esporas se realizó en muestras de 50 g de suelo de la rizósfera de las plantas colectadas, según el método de extracción descrito por Gerdeman y Nicolson (1963), modificado por Herrera *et al.*, (1995), basado en el tamizado y decantado por vía húmeda de los propágulos del hongo. Las esporas se colectaron sobre una malla de 40  $\mu\text{m}$  de apertura, se separaron por centrifugación con sacarosa y Tween 80 y se observaron posteriormente en un estereomicroscopio óptico (20 - 40x).

**3.5. Análisis estadístico**

Para el procesamiento estadístico se comprobó la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza, los cuales cumplieron con este requisito, por lo que se procedió a realizar el análisis de varianza a los datos originales según Vásquez (2011).

En función del diseño experimental empleado, se comprobó el efecto de los factores y su interacción. Para la determinación de las diferencias entre los tratamientos se utilizó la dócima de comparación de Rangos Múltiples de Duncan para  $p \leq 0,05$ . Mediante el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS versión 5,1.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

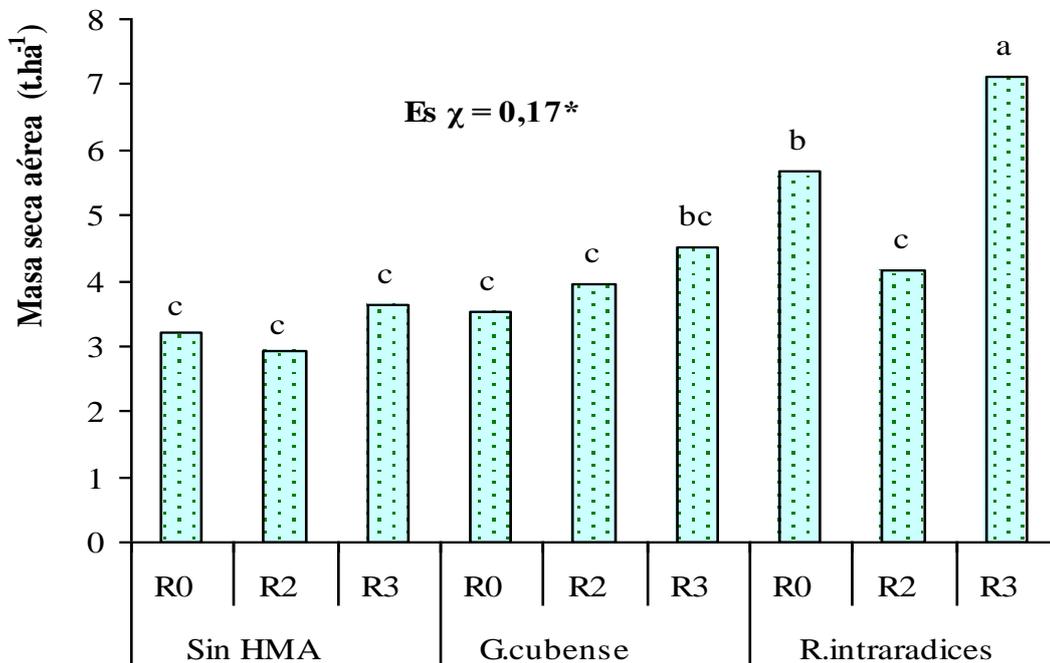
#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. Masa seca aérea de *Canavalia* a los 70 días después de germinada

Al analizar el efecto de la coinoculación *Rhizobium* - HMA sobre la masa seca aérea de *Canavalia*, se observó interacción entre los factores de estudio a los 70 días después de germinada. La inoculación de *R. intraradices* combinada con el aislado Can 5 incrementó este indicador y fue superior al resto de las demás cepas, lográndose rendimientos de 7,12 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca aérea en el período de estudio (**Figura 1**).

Por otra parte se encontró que la cepa *R. intraradices* en el tratamiento sin inoculación bacteriana, mostró el segundo mejor efecto positivo en relación a los demás tratamientos.

Sin embargo con la aplicación simple y combinada de *Rhizobium* y *G. cubense*, disminuyó la producción de masa seca aérea respectivamente sin diferencias significativas, lo que indica que esta cepa de HMA manifestó menor efecto simbiótico que *R. intraradices*.



**Figura 1: Producción de masa seca aérea.** Leyenda: R0: sin *Rhizobium*, R2 y R3: aislados de *Rhizobium* (Can 2 y Can 5). \*Medias con letras distintas difieren entre sí, según prueba de Rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

De esta manera, la mayor producción de masa seca aérea se obtuvo en presencia de las combinaciones de los aislados de *Rhizobium* y *R. intraradices*, destacándose en este sentido la coinoculación del aislado Can 5 y esta cepa de HMA. Estos resultados están en correspondencia con días largos y con altas precipitaciones, en este caso osciló entre 164 y 190 mm en la región, lo que favoreció el incremento vegetativo de esta especie en un período menos prolongado.

Se ha demostrado que las leguminosas en el verano crecen más rápido y acumulan más N, debido a la intensidad de la luz solar (Cherr *et al.* 2006). Al aumentar las precipitaciones, se intensifica el crecimiento de las plantas empleadas como abono verde (Filho *et al.* 2004) y a mayor producción de fitomasa, se incrementa el contenido de nutrientes (Perín *et al.*, 2004).

Por otra parte, se ha informado que la adecuada inoculación de una leguminosa con cepas efectivas, provoca un aumento de la masa aérea de las plantas (Jiménez y Peña, 2000), aunque numerosos reportes indican que *Canavalia* es un género promiscuo que puede establecer simbiosis efectiva con varias cepas de *Rhizobium* (Beyra *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2012a).

Estudios realizados por Aguilar (2005), sobre el efecto de *Canavalia* como abono verde en sistemas agrícolas, demostró que la producción de masa aérea se incrementó favorablemente con el inicio de las lluvias, lográndose 5,33 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca, además del incremento de 106 kg.ha<sup>-1</sup> de N y 12,5 kg.ha<sup>-1</sup> de P en la absorción de nutrientes.

Resultados obtenidos por Álvarez *et al.* (1995) y García (1997), informaron que en las condiciones de Cuba para suelos Ferralíticos Rojos, *Canavalia* crece y se desarrolla muy rápido en la época de primavera, coincidiendo con los meses más lluviosos (mayo – octubre), lográndose abundante producción de cobertura y masa foliar, con portes de 0,6 a 1,0 m de altura, un promedio de 3,4 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca y una adecuada extracción de nutrientes de 153 kg.ha<sup>-1</sup> de N para esta especie.

También Martín *et al.* (2012), informaron resultados positivos de la inoculación *G. cubense* (cepa INCAM-4) sobre el funcionamiento micorrízico de *Canavalia* en su efecto de permanencia del cultivo del maíz para dos campañas diferentes, el

crecimiento de las plantas de este especie fue superior (primavera ) con relación al invierno, alcanzando entre 2,24 - 4,58 t.ha<sup>-1</sup> y 2,82 - 5,38 t.ha<sup>-1</sup> de masa seca sin y con inoculación micorrízica respectivamente, con bajo número inicial de esporas residentes en el suelo y sin aplicaciones previas del inoculante micorrízico.

Investigaciones realizadas por Jiménez *et al.* (2005), en la producción de masa seca y contenido de nutrientes de plantas empleadas como abonos verdes, informaron que para obtener altas producciones de masa, deben ser favorables los factores como las propiedades físico- químicas del suelo, la fisiología de las plantas, la época de siembra y el manejo del cultivo entre otros, lo que estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Corbera y Nápoles (2013), informaron que la masa seca de la parte aérea de las plantas de soya fueron superiores cuando se usó la coinoculación *Bradyrhizobium elkanii* - HMA, incrementos que oscilaron entre 8,68 y 15,48 g por planta<sup>-1</sup>.

Por otro lado, Puertas *et al.* (2008), en el establecimiento de cultivos de cobertura en suelo de trópico húmedo en la amazonía peruana, informaron que el porcentaje de cobertura alcanzado por Canavalia, fue superior a los demás cultivos, lográndose el cubrimiento total del suelo a los 90 días después de la siembra con un incremento de masa aérea de 4,59 t.ha<sup>1</sup>.

Con respecto al incremento de masa seca por diferentes leguminosas empleadas como abonos verdes, Ruiz (2001); Sánchez *et al.* (2003) y Bustamante *et al.* (2010) informaron, que los abonos verdes son especies que se adaptan bien a las condiciones tropicales, a diferentes tipos de suelos y que, en condiciones favorables en diferentes regiones de Cuba, seleccionando la mejor época de siembra, alcanzan un exuberante crecimiento y desarrollo, atribuida en una mayor masa aérea en las plantas.

En cuanto a las respuestas de los tratamientos inoculados por las diferentes cepas de HMA, se ha informado anteriormente por Simó *et al.* (2009), efectos de la inoculación micorrízica de Canavalia con la cepa de HMA *G. intraradices* actualmente *R. intraradices* (Schüßler y Walker, 2011) en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado, atribuidos a incrementos de la masa verde y

seca y del contenido de nutrientes de las plantas inoculadas respecto a los tratamientos no inoculados, lo que demuestra el efecto positivo de la inoculación micorrízica sobre las especies de abonos verdes, al aumentar su valor agronómico.

Por su parte, Bustamante *et al.* (2010), informaron que en suelos Pardos sin carbonatos, la coinoculación con variadas combinaciones de cepas de *Rhizobium* - HMA en Canavalia, se refleja en su crecimiento y desarrollo, independientemente del indicador evaluado. En este orden, el efecto de la coinoculación del aislado Can 5 y *G. hoi-like* incrementó la altura de la planta, no siendo así la combinación de la cepa Can 2003a con *G. hoi-like* que alcanzó el menor valor, en el caso de la masa fresca el mayor incremento se alcanzó con la combinación Can 2003b con *R. intraradices*, mientras que este indicador se deprimió significativamente con *G. hoi-like* y el aislado Can 5.

Ramírez *et al.* (2013) en estudios realizados sobre la coinoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno y HMA *G. fasciculatum* en plantas de Caupí, informaron incrementos significativos de la masa seca aérea en los tratamientos coinoculados, en comparación con aquellos no inoculados, atribuyendo estos resultados a la simbiosis efectiva entre el microsimbionte y el macrosimbionte.

Reyes (2013), en estudios realizados sobre la coinoculación de aislados de *Rhizobium* y cepas de HMA en diferentes tipos de suelo, informó que en presencia de la coinoculación, se incrementó la masa seca aérea de Canavalia en suelo Ferralítico Rojo, destacándose la combinación del aislado Can 2 y *G. cubense*. Sin embargo, en el caso del suelo Gley Nodular Ferruginoso, el mejor comportamiento se obtuvo con la coinoculación de los aislados Can 3, Can 4 y Can 5 y *Glomus mosseae*.

El mismo autor plantea, que los resultados obtenidos de masa seca que osciló entre valores de 2,5 a 10 t.ha<sup>-1</sup> en Canavalia, es debido a que fue sembrada en época óptima, en este caso, en condiciones de altas temperaturas y humedad (verano), lo que la hace tener un crecimiento exuberante.

#### 4.2. Nodulación de Canavalia a los 70 días después de germinada

La **Tabla 4** muestra la interacción entre los factores en estudio (*Rhizobium* - HMA) en la nodulación de Canavalia. Se observaron respuestas significativas de las variables a la coinoculación de ambos microorganismos, con efecto superior la cepa *R. intraradices* con respecto a la cepa *G. cubense* y el testigo sin inocular, donde nuevamente la combinación de *R. intraradices* con el aislado Can 5 incrementó significativamente estos indicadores. En este tratamiento se observó una relación de 983,66 de nódulos totales así como 99,99 % de nódulos funcionales y 53,86 de masa de los nódulos a los 70 días después de germinada. Estos resultados coinciden con el mejor tratamiento para la producción de masa seca aérea (Figura 1) antes analizada, lo que indica que la alta nodulación y efectividad obtenida con el aislado Can 5, pudo influir en el incremento de la masa seca aérea.

Por otra parte se observa que no existió diferencias significativas entre los tratamientos combinados con los aislados de *Rhizobium* más *G. cubense* y aquellos que no fueron inoculados. En este sentido es necesario destacar que aunque no existió diferencia estadísticamente significativa, la nodulación con inoculación simple de *Rhizobium* fue alta, pero inferior con respecto a los tratamientos coinoculados, debido al efecto beneficioso ejercido por la asociación tripartita de los microsimbiontes y el macrosimbionte.

Por otra parte, cuando analizamos la masa seca de los nódulos para los tratamientos con y sin *Rhizobium* inoculado con la cepa *G. cubense* y sin HMA, podemos ver que no existe diferencia en todos los casos, sin embargo la nodulación es alta, puede estar ocurriendo que las cepas residentes de *Rhizobium* en el suelo en conjunto con las inoculadas surjan el mismo efecto positivo para la nodulación de Canavalia, teniendo relación esto con la funcionalidad de los nódulos.

**Tabla 4. Efecto de la inoculación simple y combinada de *Rhizobium* y HMA en la nodulación de *Canavalia* a los 70 ddg.**

Tratamientos		Variables de la nodulación		
		Nódulos totales (u)	Masa seca nódulos (g por planta)	Funcionabilidad (%)
<b>Sin HMA</b>	R0	433,66c	19,93c	80,16
	R2	528,66c	26,8c	84,54
	R3	585,33c	29,33c	88,43
<b><i>Glomus cubense</i></b>	R0	510,66c	23,763c	90,37
	R2	621,33c	31,53c	94,12
	R3	670,0b	39,9bc	96,90
<b><i>Rhizophagus intraradices</i></b>	R0	642,33bc	36,13c	96,12
	R2	664,66b	39,16bc	97,90
	R3	983,66a	53,86a	99,99
<b>Es <math>\chi</math></b>		<b>7,31*</b>	<b>1,07*</b>	

\*Medias con letras distintas en la misma columna difieren entre sí, según prueba de Rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). R0: sin *Rhizobium*, R2 y R3: aislados de *Rhizobium* (Can 2 y Can 5 respectivamente). ddg: días después de la germinación.

También, se plantea que la relación simbiótica entre *Rhizobium* - HMA - leguminosas, pudo facilitar un intenso intercambio de señales entre los simbioses, donde se destaca la liberación de compuestos isoflavonoides por la raíz, que inducen la síntesis de los factores de la nodulación en la bacteria (Freixas *et al.*, 2010; Martínez - Viera y Dibut, 2012).

En este caso el género *Rhizobium* puede cederle a la planta N en forma asimilable para la misma, y a su vez, la planta suministra las sustancias nutritivas que necesitan las especies de *Rhizobium* para cumplir sus funciones vitales y por otra lado se conoce que las micorrizas incrementan la absorción de otros elementos, entre ellos el P, muy importante para garantizar una adecuada FBN y crecimiento de las plantas, dando lugar a un mayor crecimiento, número de nódulos, masa de los nódulos y mayores contenidos de N y P en las plantas (Rivera y Fernández, 2003).

Por otra parte, Parra (2012) en estudios realizados sobre el efecto de la coinoculación *Rhizobium* - HMA en el desarrollo de *Cajanus cajan* en presencia de abonos verdes, informó incrementos de número y peso de los nódulos de *Cajanus cajan* en los tratamientos coinoculados en comparación con aquellos que no fueron inoculados con aplicación de microorganismos.

Resultados obtenidos por Bustamante *et al.* (2009; 2010), en suelos Pardos sin Carbonatos, informaron que el aislado Can 3 propició incrementos de 306 en el número de nódulos totales de *Canavalia* con respecto al testigo sin inoculación, y en el caso de la coinoculación con cepas de *Rhizobium* y HMA en *Canavalia*, la inoculación con la cepa 2003a y *G. moseae* aumentó el número de nódulos efectivos en *Canavalia*.

Gómez *et al.* (2009), al estudiar el efecto de la coinoculación *Rhizobium* - *Glomus fasciculatum* en frijol Caupí en un suelo Fluvisol, informaron que ejerció un efecto estimulante, tanto sobre la producción de nódulos en las plantas, como también la cantidad de nódulos efectivos.

En estudios recientes Córdova - Sánchez *et al.* (2013), al evaluar la FBN en cuatro leguminosas crecidas en suelos de Tabasco, México, informaron que *Cajanus cajan* presentó mayor número y masa seca de los nódulos, comparado con *Mucuna deerengiana*, *Phaseolus lunatus* y *Canavalia ensiformis*, llegando a alcanzar 88,11 nódulos por planta, que al ser comparado con los valores reportados por Mayz-Figueroa (2007) fueron inferiores, atribuyéndolo probablemente a la competencia por nutrientes y bajo contenido de P asimilable.

Corbera y Nápoles (2013), informaron respuestas significativas en las variables número, masa seca y efectividad de los nódulos en los tratamientos evaluados en el cultivo de la soya, destacándose aquellos donde se aplicó la coinoculación *Bradyrhizobium elkanii* - HMA, enfatizando que la aplicación de las micorrizas arbusculares propició un mayor efecto de las bacterias de rizobios, dado por un incremento en el número de nódulos y la masa seca de los mismos en comparación con el testigo absoluto.

### 4.3. Variables del funcionamiento fúngico.

En la **Tabla 5**, se observa el efecto de la interacción entre los factores en estudio sobre el porcentaje de colonización micorrízica y densidad visual de Canavalia. Se encontró una marcada tendencia a valores superiores de colonización y densidad visual en tratamientos inoculados con cepas de HMA, con respecto a aquellos sin inoculación micorrízica. En todos los casos, los porcentajes de colonización presentan valores por encima del 30 % y en los tratamientos más destacados, alcanzan valores superiores al 60 %. Igualmente la densidad visual, indicador que describe el grado de intensidad con la que el hongo coloniza la raíz alcanzó un valor de 9,47 % en los tratamientos inoculados.

En este caso, *R. intraradices* en combinación con el aislado Can 5, mostró los mejores resultados de colonización micorrízica y densidad visual con valores de 81,73 y 9,47 % en el período evaluado. Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos en la producción de masa seca aérea y la nodulación de Canavalia en la Figura 1 y Tabla 4. Este comportamiento pudo estar determinado por la especificidad que se estableció entre el tipo de suelo y el HMA, lo que produjo un mayor grado de compatibilidad entre los simbiontes, lo cual parece indicar que *R. intraradices* de conjunto con el aislado Can 5 sean las más eficientes en estas condiciones.

Por otro lado, se demuestra la eficiencia y la efectividad de la inoculación de la cepa *R. intraradices* en relación con el porcentaje de colonización micorrízica y la densidad visual en Canavalia para este suelo, resultados que están en similitud con lo planteado por Ruiz (2001); Rivera y Fernández (2003) y Rivera *et al.* (2007), los cuales informaron que *G. intraradices* es la cepa más efectiva y eficiente para la inoculación micorrízica de los cultivos en suelos Pardos con Carbonatos.

**Tabla 5. Efecto de la interacción de *Rhizobium* y HMA sobre la colonización micorrízica y la densidad visual para *Canavalia* a los 70 ddg**

Tratamientos		Período lluvioso	
		Colonización (%)	Densidad visual (%)
<b>Sin HMA</b>	R0	56,53d	3,84e
	R2	49,20d	3,67e
	R3	64,77cd	4,81de
<b><i>Glomus cubense</i></b>	R0	66,78c	5,14de
	R2	62,25d	5,87d
	R3	67,66c	5,87d
<b><i>Rhizophagus intraradices</i></b>	R0	70,62b	7,76b
	R2	67,00c	6,97c
	R3	81,73a	9,47a
<b>Es <math>\chi</math></b>		<b>2,26*</b>	<b>0,50*</b>

\*Medias con letras distintas en la misma columna difieren entre sí, según prueba de Rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ). R0: sin *Rhizobium*, R2 y R3: aislados de *Rhizobium* (Can 2 y Can 5 respectivamente). ddg: días después de la germinación.

También, se evidenciaron incrementos significativos para estos indicadores en los tratamientos de *R. intraradices* sin inoculación bacteriana, lo que indica la presencia de cepas residentes de ambos microorganismos, que son compatibles con el cultivo y que tienen respuesta similar o superior a la coinoculación de los aislados de *Rhizobium* y cepas de HMA en *Canavalia* para el período evaluado.

Estos resultados están indicando además el efecto positivo de las asociaciones simbióticas de *Canavalia* con los aislados de *Rhizobium* y cepas de HMA, reflejado en una mejor colonización micorrízica y densidad visual bajo estas condiciones, estando en correspondencia con Siqueira y Franco (1988) quienes informaron que las especies tropicales, en especial las leguminosas, responden positivamente a la coinoculación con microorganismos benéficos, existiendo un marcado sinergismo en la interacción tripartita *Rhizobium* - HMA - leguminosas.

Vélez (2012), informó que el aumento del porcentaje de colonización micorrízica pudo estar ocasionado por las acciones que ejercen los HMA en el incremento y la absorción de nutrientes disponibles para las plantas.

En estudios realizados por Martín (2009), sobre indicadores del funcionamiento de la simbiosis micorrízica de *Canavalia* en suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados, observó un efecto diferenciado de la inoculación con cepas de HMA sobre los porcentajes de colonización micorrízica y de la densidad visual en las raíces de *Canavalia*. Los mayores valores se obtuvieron con la cepa *Glomus hoi-like*, con diferencias respecto a las otras dos cepas inoculadas y al testigo sin inoculación en los dos años estudiados, resultados que están en correspondencia con los obtenidos en la producción de masa seca y absorción de nutrientes. El mismo autor refiere que al existir un mejor comportamiento de la simbiosis micorrízica, se estimula el desarrollo vegetativo de la *Canavalia*.

Los resultados encontrados en esta investigación están en similitud con los obtenidos por Marrero (2010), cuando evaluó la colonización micorrízica de *G. intraradices* en suelos Pardos Mullidos Carbonatados y encontró porcentajes de colonización micorrízica entre 66 y 70 %, valores que indicaron una micorrización efectiva.

Muñoz *et al.* (2009), en estudios de identificación y colonización micorrízica en cultivos de cobertura, informaron que la micorrización fue efectiva en condiciones edafoclimáticas favorables, lo que promovió un incremento en la diversidad, desarrollo y actividad de los microorganismos benéficos, en especial de hongos micorrízicos arbusculares.

Martín *et al.* (2010), al analizar los indicadores del comportamiento de la simbiosis micorrízica de *Canavalia* en suelos Ferralíticos Rojos con las cepas *G. hoi-like*, *G. mosseae* actualmente *Funneliformis mosseae* y *G. claroideum* reclasificada como *Claroideoglomus claroideum*, informaron un efecto de la inoculación con cepas de HMA sobre el porcentaje de colonización y densidad visual de las raíces de *Canavalia*; logrando mayores valores con la cepa *G. hoi-like*, con diferencias respecto a las otras dos inoculadas y el testigo sin inoculación en los dos años estudiados, resultados que están en correspondencia con los contenidos de masa seca y nutrientes encontrados en

el abono verde, debido al comportamiento de la simbiosis micorrízica, que estimuló el desarrollo vegetativo de la Canavalia.

Por otra parte, Cedeño (2010), en estudios realizados sobre la evaluación de la efectividad de la micorrización sobre el desarrollo y estado nutritivo de *Bactris gasipaes*, informó que el porcentaje de colonización micorrízica se comportó de forma similar o superior en los tratamientos no micorrizados con respecto aquellos que fueron inoculados, atribuyendo estos resultados a que la población de cepas residentes en el suelo fueron compactibles con el macrosimbionte y que se comportaron tan eficientes como las introducidas que al parecer, estas últimas disminuyeron el efecto de la micorrización.

González *et al.* (2012), en la coinoculación de cepas de *Rhizobium* y una cepa de hongo micorrízico arbuscular (*Glomus cubense*) en suelo Ferralítico Rojo Lixiviado, informaron que los tratamientos inoculados con *G. cubense* mostraron incrementos de la colonización micorrízica, la densidad visual y la densidad de esporas en la rizosfera de las plantas, significativamente mayores que los no inoculados, al mismo tiempo, estas variables fúngicas alcanzaron valores más altos cuando la inoculación de *G. cubense* se combinó con una u otra cepa de *Rhizobium*.

Pérez-Luna *et al.* (2012), informaron incrementos de porcentajes de colonización y densidad visual sobre *Mucuna deeringiana* evaluada como cultivo de cobertura, al ser inoculada con cepas de hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus geosporum*, *G. claroideum* y *Rhizophagus intraradices*), encontrándose los mejores resultados con *R. intraradices*. El nivel de porcentaje de colonización fue más alto con inoculación de micorrizas en relación al testigo, concluyendo que la inoculación micorrízica tuvo un efecto positivo en la colonización de la raíz.

Por otra parte, Parra (2012) en estudios realizados sobre el efecto de *Rhizobium* y micorrizas arbusculares en el desarrollo de *Cajanus cajan* empleado como abonos verdes, en suelos naturales de la localidad de Espino, estado Guárico, informó que los valores sobre los porcentajes colonización micorrízica y densidad visual más altos, fueron encontrados en los tratamientos

con la doble coinoculación, en comparación con los demás tratamientos donde solo se hizo una aplicación por separado.

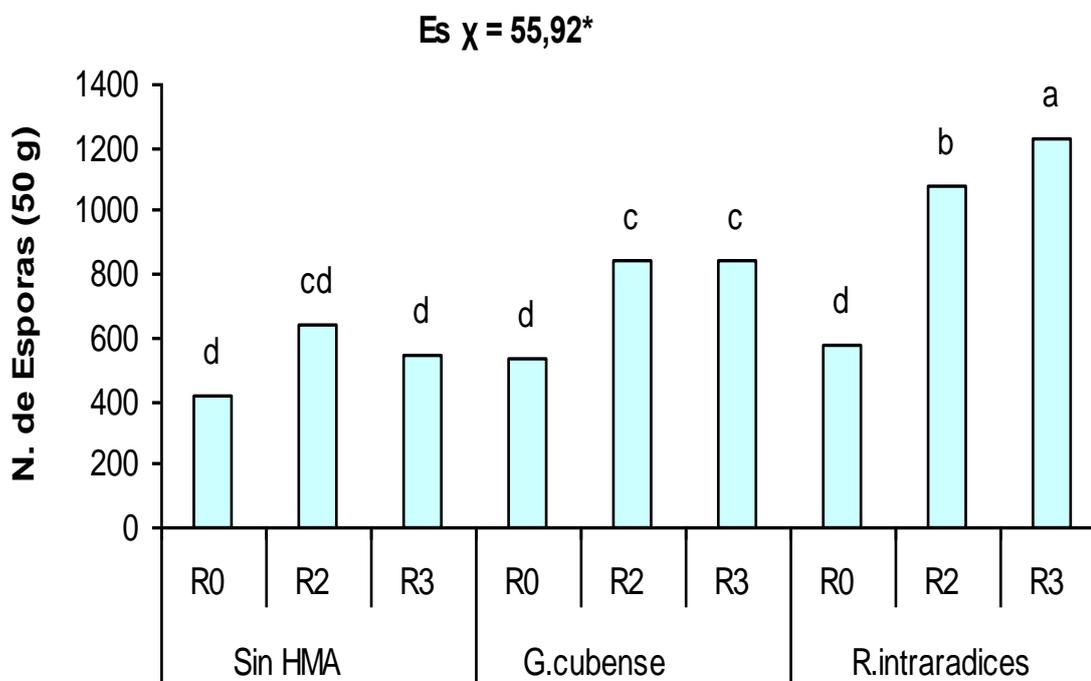
Este mismo autor refiere que estos valores de micorrización contribuyeron a mejorar los valores de masa seca aérea y la extracción de nutrientes de *Cajanus cajan* en todos los momentos estudiados.

#### **4.4. Número de esporas de HMA en la rizosfera de Canavalia a los 70 días después de germinada.**

En la **Figura 2**, se aprecian los valores obtenidos de número de esporas en 50 g de suelo presente en la rizosfera de Canavalia a hasta los 70 días después de germinada, en la cual se puede observar la interacción entre los factores en estudio. De manera general existió un incremento del número de esporas en los tratamientos coinoculados con respecto al testigo sin inocular, destacándose las combinaciones de *R. intraradices* con el aislado Can 5, alcanzando un valor de 1237 esporas por 50 g de suelo en el tiempo evaluado, siendo superior a los tratamientos coinoculados con la cepa *G. cubense* y los aislados de *Rhizobium*. Infiriendo que después de este período los propágulos micorrízicos se pueden multiplicar y de esta manera incrementarse el número de esporas, lo que es peculiar de este abono verde, ventaja que le confiere al cultivo posterior sobre el buen funcionamiento micorrízico.

Este indicador logró reflejar los efectos de la coinoculación de estos dos microorganismos, no solo expresado en los porcentajes de colonización, densidad visual y masa seca aérea (Figura 1 y Tabla 5), sino también en un mayor número de esporas en la rizosfera de las plantas.

Por otra parte, se evidenció que existieron cepas residentes de HMA en el suelo, que al interactuar con la Canavalia inoculada con los aislados de *Rhizobium*, incrementaron su actividad simbiótica, lográndose aumentar el número de esporas en la rizosfera, probablemente debido a la interacción de la simbiosis tripartita *Rhizobium*- HMA- leguminosas, de manera que la simbiosis *Rhizobium* – leguminosas aporta el N de forma asimilable para las plantas y los HMA incrementan la absorción de otros elementos, entre ellos el P, muy importante para el proceso la FBN.



**Figura 2: Número de esporas de HMA en la rizosfera de Canavalia.** R0: sin *Rhizobium*, R2 y R3: aislados de *Rhizobium* (Can 2 y Can 5 respectivamente). \*Medias con letras distintas difieren entre sí, según prueba de Rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, se observó que en este período lluvioso que coincide con la época de primavera, favoreció el incremento del número de esporas. Se puede apreciar que no se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos, exceptuando la coinoculación de *R. intraradices* con el aislado Can 5 y Can 2, probablemente debido a las condiciones edafoclimáticas, que fueron favorables en esta época de estudio, permitiendo un mejor funcionamiento simbiótico entre los organismos involucrados, de manera que tuvo un efecto similar entre los tratamientos y por tanto es evidente encontrar que los tratamientos

coinoculados con la cepa *G. cubense* y los aislados de *Rhizobium* no estuviesen diferencia significativa en el efecto de la micorrización.

La mayor cantidad de esporas encontradas en los tratamientos coinoculados con *Rhizobium* - HMA, específicamente la combinación del aislado Can 5 - *R. intraradices*, coincide con los resultados obtenidos por este mismo tratamiento en las variables de funcionamiento fúngico y producción de masa seca aérea analizadas anteriormente.

Estos valores indican, que a medida que el funcionamiento micorrízico resultó más efectivo, conllevó a mayores porcentajes de colonización micorrízica y a mayor reproducción de propágulos micorrízicos en el suelo, demostrando la efectividad de la coinoculación *Rhizobium* - HMA, al encontrarse los mayores valores de las variables evaluadas en presencia de la coinoculación, al ser comparadas con aquellos tratamientos que solo se inocularon con un microorganismo.

Este resultado es un indicador de las ventajas de la simbiosis *Rhizobium* - HMA- leguminosa, en la cual todas las partes se potencian y de esta manera se incrementa su valor agronómico, lo que puede repercutir en un mayor impacto de su introducción en los agroecosistemas.

Al respecto, Barrios *et al.* (2006) y Deguchi *et al.* (2007), informaron aumentos entre dos y tres veces de las poblaciones de HMA por el uso de abonos verdes micorrizados, incrementando además la colonización micorrízica de los cultivos posteriores.

Resultados similares fueron obtenidos por Bustamante *et al.* (2009) y Bustamante *et al.* (2010), quienes al inocular los aislados de *Rhizobium* Can 3 y Can 5 con *R. intraradices* y *G. cubense* en suelos Pardos sin Carbonatos, encontraron interacción entre las cepas de *Rhizobium* y de los hongos micorrízicos arbusculares con incrementos significativos en los indicadores de crecimiento de Canavalia.

Rivera *et al.* (2010), en el cultivo del cafeto con el empleo de los abonos verdes en suelo Fersialítico Rojo Lixiviado, plantearon que el número de esporas de los hongos micorrízicos arbusculares se incrementa significativamente en el suelo, producto del crecimiento de los abonos verdes, encontrándose una

positiva relación lineal entre la masa seca de los abonos verdes a los 70 días después de germinados y las cantidades de esporas de HMA en el suelo al momento de incorporarlo.

Por otra parte Martín *et al.* (2010), informaron que la cepa *G. hoi-like* presentó mayor número de esporas que las demás cepas de HMA en estudio para *Canavalia* cultivada en suelo Ferralítico Rojo, siendo esta efectiva no solo en el crecimiento y la nutrición, sino también en la reproducción de los propágulos micorrízicos, lo cual constituyó otro beneficio obtenido con empleo de los abonos verdes.

Sánchez *et al.* (2011), en sus estudios de abonos verdes e inoculación micorrízica en suelo Ferralítico Rojo Lixiviado, informaron que el incremento de esporas de HMA en el suelo fue debido al crecimiento de los abonos verdes, encontrándose una relación entre la masa seca producida y las esporas encontradas en la rizosfera de las plantas de *Canavalia*, destacando además que la intensidad de reproducción de los propágulos estuvo directamente relacionada con las diferencias en crecimiento de los abonos verdes y explicables en que la multiplicación de las esporas fue consecuencia, no solo de la dependencia micorrízica de estos cultivos, sino también del crecimiento de las plantas.

Martín *et al.* (2012), informaron que *Canavalia* es una especie vegetal que entre otras ventajas, al ser empleada como abono verde, tiene la peculiaridad de multiplicar los propágulos de HMA en el suelo, sean residentes o no inoculados y propiciar de esta manera la colonización micorrízica del cultivo posterior, otorgándole a esta especie un valor agregado como abono verde en los sistemas agrícolas.

En estudios recientes, Reyes (2013) encontró que la especie *Canavalia ensiformis* (L) D.C fue capaz de responder a la coinoculación de *Rhizobium* sp. y hongos micorrízicos arbusculares en dos suelos de Cuba, obteniéndose resultados superiores con la coinoculación del aislado Can 5 y *R. intraradices* con respecto a los tratamientos que fueron coinoculados con otros aislados de *Rhizobium* y la cepa *G. cubense*. De manera que para este tipo de suelo, el aislado de *Rhizobium* sp. Can 5 proveniente de nódulos de *Canavalia* y la cepa

de HMA *Rhizophagus intraradices* resultaron ser las más efectivas, lo que ratifica el efecto de la alta especificidad cepa de HMA – tipo de suelo.

CONCLUSIONES

## V. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el experimento se puede concluir que:

- La coinoculación de la *Canavalia* con *Rhizobium* sp. y hongos micorrízicos arbusculares, incrementó las variables de funcionamiento fúngico, alcanzando un valor de 81,73 % de colonización radical y 9,47 % de la densidad visual, así como las relacionadas con la nodulación de *Rhizobium* sp., lográndose de 983,66 de nódulos totales; con 99,99 % de efectividad de los nódulos y de 53,86 de masa seca de los nódulos.
- El aislado Can 5 combinado con la cepa de HMA *Rhizophagus intraradices*, se comportaron como los microorganismos más eficientes para la inoculación de *Canavalia ensiformis* cultivada en suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado, al garantizar los mayores acumulados de todos los indicadores evaluados.
- En presencia de la coinoculación de aislados de *Rhizobium* sp. y hongos micorrízicos arbusculares, se incrementó la producción de masa seca de la parte aérea de *Canavalia*, alcanzando un valor de 7,12 t.ha<sup>-1</sup> en el período estudiado.

RECOMENDACIONES

## VII. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en la investigación, se recomienda lo siguiente:

- Coinocular la *Canavalia ensiformis* con bacterias del género *Rhizobium*, en este caso con el aislado Can 5 y la cepa de HMA *Rhizophagus intraradices* en suelos Pardo Sialítico Mullido Carbonatado, para elevar el valor agronómico de esta especie.
- Continuar estudios más específicos de coinoculación de diferentes especies de abonos verdes con bacterias del género *Rhizobium* y hongos micorrizicos arbusculares.
- Que los resultados de este trabajo, sean utilizados como material de consulta para estudiantes de pre y postgrado, productores e investigadores de la rama agrícola.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agarwal, P.; Sah, P. 2009. Ecological importance of ectomycorrhizae in world forest ecosystems. *Nature and Science*. 7: 107-116.
2. Aguilar, N. 2005. Efecto del abono verde de *Canavalia ensiformis* (Canavalia) en sistemas agrícolas. Centro de Información Documental Agropecuaria (CIDAGRO), Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). 7p.
3. Álvarez, M. 2000. Los abonos verdes: una alternativa para la producción sostenible de maíz en las condiciones de los suelos Ferralíticos Rojos de la Habana. Tesis de Maestría en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. UNAH. La Habana. 69 p.
4. Alvarez, M.; García, M.; Treto, E. 1995. Los abonos verdes: una alternativa natural y económica para la agricultura. *Cultivos Tropicales*. 16 (3): 9-24.
5. Angulo, J.; Carre, B.; Harcoast, J.; Picard, M. 1986. Composición química y papel de aminoácidos del grano de *Canavalia ensiformis* como recurso para la alimentación animal. XXXVI Convención Anual de ASOVAC. Caracas. Venezuela. Suplemento. 1: 153-163.
6. Astier, M.; Maass, J.; Etchevers, B.; Peña, J.; González, F. 2006. Short-term green manure and tillage management effects on maize yield and soil quality in an Andisol. *Soil and Tillage Research*. 88: 153-159.
7. Augé, R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis, en *Mycorrhiza*. 11: 3-42.
8. Baca, B.; Urzua, B.; Pardo, P. (2000) Fijación biológica del nitrógeno. *Ciencia y cultura elementos* No. 38, Vol. 7. p. 43
9. Barea J.M.;Toro, M.; Orozco, M.; Campos, E.; Azcón R. (2002). The application of isotopic ( $^{32}\text{P}$  and  $^{15}\text{N}$ ) dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and Rizobios to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops nutrient cycling in agroecosystems 63:35-42
10. Barea, J.M.; Azcón-Aguilar, C.; Ocampo, J.A.; Azcón, R.1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas arbusculares. En: *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes*. II. Fijación de N y Micorrizas. Madrid: CSIC. 149-173.

11. Barrera, T. 2010. Uso y manejo de leguminosas y su aporte a la sostenibilidad de sistemas de producción en zonas tropicales. Postgrado en Ciencia del Suelo, Universidad Central de Venezuela. Maracay. 13 p.
12. Barrios, E.; Mahuku, G.; Navia, J.; Cortés, L.; Asakawa, N.; Jara, C.; Quintero, J. 2006. Green manure impact on nematodes, arbuscular mycorrhizal and pathogenic fungi in tropical soils planted to common beans. En: World Congress of Soil Science (18th:2006, July 9-15, Philadelphia).
13. Bauer, T. 2001. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: familia *Rhizobiaceae*. Disponible en:
14. Beyra, A.; Matos, G.; Reyes, A. 2004. Revisión taxonómica del género *Canavalia* DC. (Leguminosae papilionoideae) en Cuba. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas. 28 (107): 157-175.
15. Biederbeck, V.O.; Zentne, R.P.; Campbell, C.A. 2005. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. Soil Biol. Biochem. 37: 1775 – 1784.
16. Borges, M. 2009. Influencia de la *Canavalia ensiformis* (L) D.C en algunas propiedades de un suelo Ferralítico Rojo. Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Ciencias del Suelo. Universidad Agraria de la Habana. 60 p.
17. Bustamante, C.; Pérez, A.; Viñals, R.; Rivera, R.; Pérez, G.; Rodríguez, M. 2009. Efecto de la inoculación con cepas de *Rhizobium* sobre indicadores de crecimiento y producción de masa por *Canavalia ensiformis* intercalada con café en suelo Pardo de Cuba. Presentaciones. Taller Nacional de la Red Temática de Simbiosis Micorrízica 25 al 27 de noviembre de 2009. Memorias. CD – ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
18. Bustamante, C.; Rivera, R.; Pérez, G.; Viñals, R. 2010. Promoción del crecimiento de *Canavalia ensiformis* L. mediante la coinoculación de cepas de *Rhizobium* y hongos formadores de micorrizas en suelo pardo sin carbonatos. Café y Cacao. 9 (2): 5 p.
19. Cedeño, I. F. 2010. Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares residentes sobre el desarrollo y estado nutritivo del Palmito (*Bactris gasipaes* HBK) en etapa de vivero. Tesis presentada en Opción al Título de Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. 108 p.

20. Cherr, C.M.; Scholberg, J.M.S.; Sorley, M. 2006. Green manures as nitrogen source for sweet corn in a warm – temperate environment. *Agron. J.* 98: 1173 – 1180.
21. CIDICCO. 2008. Especies utilizadas como Abono verde o Cultivo de Cobertura. Disponible en: <http://www.cidicco.hn/especies/canavalia.html>. (Consultado en Noviembre de 2013).
22. Código Internacional de Nomenclatura Botánica, Wikipedia, 2014. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%B3digo\\_Internacional\\_de\\_Nomenclatura\\_Bot%C3%A1nica](http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%B3digo_Internacional_de_Nomenclatura_Bot%C3%A1nica). <23 – 1 – 09>. Consultado en Enero de 2014.
23. Corbera, J.; Nápoles, M. 2013. Efecto de la inoculación conjunta *BradyRhizobium elkanii*-hongos MA y la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal en soya (*Glycine max* (L.) Merrill), cultivar INCASOY-27. *Cultivos Tropicales*. 34 (2): 5-11.
24. Córdova-Sánchez, S.; Cárdenas-Navarro, R.; Peña-Cabriales, J. J.; Estrada, M.; Lobbit, C.; Núñez, J. A. 2013. Fijación biológica de nitrógeno por cuatro fabáceas en suelos ácidos de Tabasco, México. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 45 (1): 1-9.
25. Correa, Y. R. 2010. Estudio preliminar de la capacidad de un suelo para retener gases con efecto invernadero (GEI) en un ciclo de cultivo de maíz (*Zea mays* L.) bajo abonos verdes. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 61 p.
26. Deguchi, S.; Shimazaki, S.; Uozumi, S.; Tawaraya, K.; Kawamoto, H.; Tanaka, O. 2007. White clover living mulch increases the yield of silage corn via arbuscular mycorrhizal fungus colonization. *Plant and Soil*. 291 (1): 291-229.
27. Dhima, K.; Vasilakoglou, J.; Gatsis, Th.; Panou-Philotheou, E.; Eleftherohorinos, I. 2009. Effects of aromatic plants incorporated as green manure on weed and maize development. *Field Crops Research*. Vol. 110, No.3, 235-241p.
28. Duchicela, J. 2001. Proyecto de Tesis. Evaluación del uso de Endomicorrizasvesiculo arbusculares (MVA) en la obtención de plántulas de tomate de árbol *Solanum betaceum* Cav. ESPE-Facultad de Ciencias Agropecuarias. Sangolquí. Ecuador.

29. Embrapa, Agrobiología. 2007. Base de datos. Leguminosas. Disponible en: [http://intranet2.cnpab.embrapa.br/leguminosas/detalhes\\_busca.asp?cod\\_id=12&tema=resumo](http://intranet2.cnpab.embrapa.br/leguminosas/detalhes_busca.asp?cod_id=12&tema=resumo). (Consultado en noviembre de 2013).
30. Escobar- Acevedo, J.C.; Zuluaga-Pelaez JJ.; Colorado-Gasca G.; Paez, D. 2007. Micorriza vesícula arbúscular. Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible. Programa nacional de Transferência de Tecnología Agropecuaria. Bogotá, Colombia. 20 p.
31. Espíndola, J.A.A.; Guerra, J.G.M.; de Almeida, D.L. 1997. Adubação verde: estratégia para uma agricultura sustentável. Seropédica. Embrapa, Agrobiología. Documentos 42. 20 p.
32. Federico N.; Spagnoletti, A.; Fernández, P.; Natalia, E.; Viviana, M. 2013. Las micorrizas arbusculares y *Rhizobium* una simbiosis dual de interés. Rev Argent Microbiol. 45(2):131-132 p.
33. Fernández, E. V. J. 2012. Respuesta de la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa –HMA ante Vanadio y Niquel. Tesis de Maestría. Institución de enseñanza e investigación en ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 168 p.
34. Fernández, F.; Gómez, R.; Vanegas, L. F.; Noval, B. M. de la; Martínez, M. A. 2000. Producto inoculante micorrizógeno. Oficina Nacional de Propiedad Industrial. Cuba, Patente no. 22641.
35. Fernández, W. 2008. Fijación biológica del nitrógeno. Disponible en: <http://www.monografias.com>. Consultado en Marzo de 2014.
36. Filho, J.S.; Cardoso, A.N.; Carmona, R.; de Carvalho, A.M. 2004. Fitomassa e cobertura do solo de culturas de sucessão ao milho na Região do Cerrado. Pesq. Agropec. Bras. 39 (4): 327 – 334.
37. Freixas, J.; Reynaldo, I. M.; Nápoles, M. 2010. Influencia de la sequía sobre el metabolismo del nitrógeno fijado durante la simbiosis *BradyRhizobium*-Soya. Cultivos Tropicales. 31(2). 66-73.
38. Gallego J.; Prager, M., Sánchez de P. 2010. Efectos de dos abonos verdes sobre la mineralización del nitrógeno y la dinámica de las bacterias oxidantes del amonio y del nitrito en un ciclo productivo de maíz (*Zea mayz L*). Memorias, II congreso internacional de agroecología. VI congreso nacional de agroecología. Universidad del Cauca Popayán. Colombia. Octubre 6-8.

39. García, M. 1997. Los abonos verdes una alternativa natural y económica para la Agricultura. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana.
40. García, M.; Treto, E.; Álvarez, M. 2000b. Los abonos verdes: una alternativa para la economía de nitrógeno en el cultivo de la papa. II. Efecto de la interacción abono verde-dosis de nitrógeno. Cultivos tropicales. 21 (1): 13 – 19.
41. García, M.; Treto, E.; Álvarez, M. 2002. Época de siembra más adecuada para especies promisorias de abonos verdes en las condiciones de Cuba. Cultivos tropicales. 23 (1): 5– 14.
42. Gerdemann, J.W.; Nicholson, T.H.1963. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc., 46: 235-244.
43. Gibson, K.E.; Kobayashi, H.; Walker, G. (2008). Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. Ann Rev Gen 42, 413-441.
44. Giongo, A.; Passaglia, L.P.; Freire, J.R. (2007). Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. Biol Fertil Soils 43, 593-598.
45. Giovannetti, M.; Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84: 489 – 500.
46. Gómez, E. J.; Padilla, R.; López, R.; Zamora, A.; Santiesteban, R. 2009. Efecto de la coinoculación *Rhizobium* – micorriza en frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L.) Var. It 86 d-715, en un suelo fluvisol de la provincia Granma. Resúmenes XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología y I Conferencia Iberoamericana de Interacciones Microorganismo- Planta- Ambiente. La Habana.
47. Gómez, Z. J. 2000. La materia orgánica en los agroecosistemas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 70 p.
48. González, P.; Pérez, G.; Medina, N.; Crespo, G.; Ramírez, J.F.; Arzola, J. 2012. Coinoculación de cepas de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular (*Glomus cubense*) y su efecto en kudzú (*Pueraria phaseoloides*). Nota técnica. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 46 (3) 331-334.
49. Graham, P. H.; Draeger, K. J.; Ferrey, M. L.; Conroy, M. J.; Hammer, B. E.; Martínez, E.; Aarons, S. R.; Quinto, C. (1998). Acid pH tolerance in strains of

- Rhizobium and Bradyrhizobium, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can J Microbiol* 40, 198-207.
50. Hernández, I.; Pérez, G.; García, M.; Rosales, P.; Baños, R.; Ramírez, J.F. 2012a. Selección de aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*. 33 (3): 27-33.
51. Hernández, I.; Pérez, G.; García, M.; Rosales, P.; Gordillo, R.; Ramírez, R. 2012b. Caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*. 33(4). 21-28.
52. Herrera, R.A.; Ferrer, R.; Furrázola, E.; Oroozco, M. O. 1995. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas (VA) en un bosque tropical. *Biodiversidad en Ibero América: Ecosistemas, Evolución y Proceso sociales*, (Eds. Maximina Monasterio): Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo. Sub – programa XII, Diversidad Biológica, Mérida. 201p.
53. Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol*. 122:211-237.
- [http://www.abcagro.com/fertilizantes/abonos\\_verdes.asp](http://www.abcagro.com/fertilizantes/abonos_verdes.asp). Consultado en Enero de 2014.
- <http://www.microbiologia.com.ar/suelo/Rhizobium.html>. Consultado en noviembre de 2013.
54. INSMET. 2012. Hojas de asentamiento de las variables meteorológicas diarias. Instituto de Meteorología. CITMA. Guantánamo. Cuba.
55. Jiménez, J. J.; Peña, J. J. 2000. Fijación biológica de N<sub>2</sub> (FBN) en leguminosas de América Latina. En: *La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: el aporte de las técnicas isotópicas*. Ed. Peña, J. J. IMPROSA S.A de C.V. Guanajuato. México. 1 p.
56. Keng, J. 1996. Legume green manuring. Disponible en: <http://www.agric.gov.ab.ca/agdex/100/2300202.html>. Consultado el 10 de enero del 2014.
57. Lloyd, P. 1997. Green manure crops. Disponible en: <http://www.bury-rd.demon.co.uk/green.htm>. Consultado el 10 de enero de 2014.
58. Madero, E.; Gómez, E.; Sánchez de P, M. 2003. Propiedades físicas y químicas, algunas características del suelo a ser tomadas en cuenta en la finca: índice hídrico e índice de protección. Cuadernos ambientales No. 9.

- Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y Ministerio de Agricultura. 3-14 p.
59. Madigan, M.; Martinko, T.; Parker, J. 2004. Brok, biología de los microorganismos. Décima edición. Madrid.
60. Marrero, Y. 2010. Efecto de frecuencias de inoculación micorrízica y el laboreo sobre una secuencia de cultivos en un suelo Pardo Mullido Carbonatado. Tesis en opción al Grado de Maestro en ciencias Agrícolas. INCA, La Habana. 78 p.
61. Martín, G. M. 2009. Manejo de la inoculación micorrízica arbuscular, *Canavalia ensiformis* y la fertilización nitrogenada en plantas de maíz (*Zea mays*) cultivadas sobre suelos Ferralíticos Rojos de La Habana. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. (INCA). La Habana. 101 p.
62. Martín, G. M.; Rivera, R.; Pérez, A.; Arias, L. 2012. Respuesta de la *Canavalia ensiformis* a la inoculación micorrízica con *Glomus cubense* (cepa INCAM-4), su efecto de permanencia en el cultivo del maíz. Cultivos Tropicales.33(2): 20-28
63. Martín, G. M.; Rivera, R.; Pérez, A.; Arias, L. 2012. Respuesta de la *Canavalia ensiformis* a la inoculación micorrízica con *Glomus cubense* (cepa INCAM-4), su efecto de permanencia en el cultivo del maíz. Cultivos Tropicales.33(2): 20-28
64. Martínez- Viera, R.; Dibut, A. B. 2012. Biofertilizantes bacterianos. Editorial científico tecnica, La Habana, Cuba. 279 p.
65. Martínez, R.; López, M.; Dibut, B.; Parra, C.; Rodríguez, J. 2007. La fijación del nitrógeno atmosférico en el medio tropical, Ed. MPPAT, Caracas, 190 p.
66. Mayea, S. S.; Novo, R. S.; Valiño, A. A. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Pueblo y Educación. 2da edición. 1991.
67. Mayz, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. Revista UDO Agrícola 4 (1): 1-20.
68. Mayz-Figueroa, J. 2007. *Cajanus cajan* L. Fijación biológica de nitrógeno (FBN) en un suelo de sabana. Revista de la Facultad de. Agronomía (LUZ). 24(1): 312-317.
69. Miller, M. H.; Mcgonigle, T. P.; Addy, H. D. 1995. Functional Ecology of Vesicular Arbuscular Mycorrhizas as Influenced by Phosphate Fertilization and

- Tillage in an Agricultural Ecosystem. *Critical Reviews in Biotechnology* 15 (3-4): 241 – 255.
70. MINAG. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana. Agrinfor. 64 p.
71. Mosavi, SB.; Jafarzadeh, AA.; Nishabouri, MR.; Ostan, SH.; Feiziasl, V. 2009. Application of Rye green manure in Wheat rotation system alters soil water content and chemical characteristics under dryland condition in Maragheh. *Pakistan Journal of biological Science* 12 (2): 178-182.
72. Moulin, L.; Munive, A.; Dreyfus, B.; Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411, 948-950.
73. Muñoz, E.; Macías, C.; Ramírez, A.F.; Sánchez-Chávez, E.; Jiménez-Castro, J.; González-García, J. 2009. Identificación y colonización natural de hongos micorrízicos arbusculares en nogal. *Terra Latinoamericana* 27(4): 355-361.
74. Olivares, V. J. 2006: Fijación biológica del nitrógeno. Disponible en: <http://www.eez.csic.es-olivares/ciencia/fijación>. Consultado Enero de 2014.
75. Paneque, V.M. 2001. La fertilización de los cultivos. Aspectos teórico – prácticos para su recomendación. Folleto impreso. INCA. 25 p.
76. Paneque, V.M.; Calaña, J. M.; Calderón, M.; Borges, Y.; Hernández, T.; Caruncho, M. 2010. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Ediciones INCA, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, 160 p.
77. Parra, T. C. 2012. Efecto de *Rhizobium* y micorrizas arbusculares en el desarrollo de *Cajanus cajan* en presencia de abonos verdes, en suelos naturales de la localidad de Espino estado Guárico. Tesis presentada en Opción al grado de Master en Ciencias del Suelo. Universidad Central de Venezuela. 79 p.
78. Peña-Venegas, C.; Cardona, G.; Mazorra, A.; Arguellez, J. y Arcos A. 2006. Micorrizas arbusculares de la amazonia colombiana. *Catálogo Ilustrado*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Colombia.
79. Peoples, M. 2004. Nitrogen dynamics in legume-based pasture systems. In *SCOPE 65: Agriculture and the Nitrogen Cycle: Assessing the Impacts of*

- Fertilizer Use on Food Production and the Environment, edited by A.R. Mosier, J.K. Syers and J.R. Freney. Island Press, Washington, DC, USA.
80. Pérez-Luna, Y.; Álvarez-Solís, J.D.; Vegas, J.; Fernández, J.M.; Gómez-Álvarez, R.; Cuevas, L. 2012. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en maíz con cultivo de cobertura y biofertilizantes en Chiapas, México. *Gayana Bot.* 69 (1): 46-56 p.
  81. Perin, A.; Santos, R.H.S.; Urquiaga, S.; Guerra, J.G.M.; Cecon, P.R. 2004. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. *Pesq. Agropec. bras.* 39 (1): 35 – 40.
  82. Phillips, D.M.; Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55. 158-161.
  83. Prager, M.; Sanclemente, E.; Sánchez de P, M.; Gallego, J.; Angel- Sánchez, D. 2012. Abonos verdes: Tecnología para el manejo agroecológico de los cultivos. *Agroecología.* 7 (1): 53-62.
  84. Prager, M.; Victoria, J.A.; Sánchez de P, M. 2002. El suelo y los Abonos Verdes, una alternativa de manejo ecológico. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y Ministerio de Agricultura. Cuadernos ambientales. 7: 4-16.
  85. Puertas, F.; Arévalo, E.; Zúñiga, L.; Alegre, J.; Loli, O.; Soplin, H. 2008. Establishment of cover crops and their growth and nutrient uptake in a humid tropical soil of the peruvian amazon. *Ecología Aplicada.* 7(1,2): 7.
  86. Ramírez, J.G.; Osorno, L.; Osorio, N.W.; Morales, J.G. 2013. Alternativas Microbiológicas para mejorar el crecimiento del Caupí. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 66(2): 7035-7044.
  87. Read, DJ. 1998. Mycorrhiza-the state of the art. In: Varma A, B Hock. *Mycorrhiza Springer-Verlag. Berlin.* 3-36 p.
  88. Reyes, R. 2013. Efecto de la coinoculación de cuatro cepas de *Rhizobium* y dos de HMA sobre *Canavalia ensiformis* crecida en dos suelos cubanos. Tesis presentada en opción al grado de Ingeniero Agrónomo. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana. 36 p.

89. Rivera, R.; Fernández, F.; Fernández, K.; Ruiz, L.; Sánchez, C.; Riera, M. 2007. Advances in the management of effective arbuscular mycorrhizal symbiosis in tropical ecosystems. Pages 151-196 In: Mycorrhizae in Crop Production (eds.) Chantal Hamel and Christian Plenchette. Haworth Press, Binghamton, 67NY. Hard Cover ISBN: 978-1-56022-306-1; Soft Cover ISBN: 978-1-56022-307-8.
90. Rivera, R.; Fernández, K. 2003. Manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: el Caribe. Eds. INCA. La Habana., 166p.
91. Rivera, R.; Sánchez, C.; Caballero, D., Cupull, R.; González, C.; Urquiaga, S. 2010. Abonos verdes e inoculación micorrízica de posturas de cafeto sobre Suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados. Cultivos Tropicales. 31 (3): 75-81.
92. Rodríguez, Y.; Dalpé, Y.; Séguin, S.; Fernández, F.; Fernández, F.; Rivera, R. 2011. *Glomus cubense* sp nov., an arbuscular mycorrhizal fungus from Cuba. MYCOTAXON. 118, October–December. 337–347p.
93. Ruíz, L. 2001. Efectividad de las asociaciones micorrízicas en especies vegetales de raíces y tubérculos en suelos Pardos y Ferralíticos Rojos de la región central de Cuba. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA, La Habana. 100 p.
94. Sánchez de P. M. 2003. Actividad biológica en la rizosfera del maracuyá-*Pasiflora edulis* var. Flavicarpa en diferentes sistemas de manejo, estados de desarrollo y condiciones fitosanitarias. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid. 261 p.
95. Sánchez de P. M.; Gómez, E.; Muñoz, J. E.; Barrios, E.; Prager, M.; Bravo, O. 2007. Las endomicorrizas, expresión bioedáfica de importancia en el trópico. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Editorial Feriva. 351 p.
96. Sánchez, C. 2001. Manejo de las asociaciones micorrízicas arbusculares y abonos verdes en la producción de posturas de cafeto en algunos tipos de suelo. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana.
97. Sánchez, C.; Rivera, R.; Bustamantes, C.; Pérez, C.; Cupull, R.; González, C.; Ferrer, M. 2003. Efecto de diferentes fuentes de abonos verdes sobre el desarrollo de las posturas de cafetos en un suelo pardo gleyzoso. Primera parte. Centro Agrícola. 29 (3) 4:72-76.

98. Sánchez, C.; Rivera, R.; Caballero, D.; Cupull, R.; González, C.; Urquiaga, S. 2011. Abonos verdes e inoculación micorrízica de posturas de cafeto sobre suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados. *Cultivos Tropicales*. 32 (3): 11-17.
99. Schüßler, A. & Walker, C. 2011. Evolution of the „Plant-Symbiotic“ Fungal Phylum, Glomeromycota. *Evolution of fungi and fungal-like organisms, The Mycota XIV*. Pöggeler, S. & Wöstemeyer, J. (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 163-185.
100. Shoko, M. 2009. Exploring phosphorus, *Mucuna (Mucuna pruriens)* and nitrogen management options for sustainable maize production in a depleted kaolinitic sandy loam soil of Zimbabwe. Dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Agriculture, At Stellenbosch University. Chapter 3: 26-40.
101. Simó, J.; Ruiz, L.; Rivera, R.; Carvajal, D.; Morales, O. 2009. Contribución micorrízica en los sistemas integrados de nutrición y fertilización de bananos en Cuba. Presentaciones. Taller Nacional de la Red Temática de Simbiosis Micorrízica 25 al 27 de noviembre de 2009. Memorias. CD – ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
102. Siqueira, J.O.; Franco, A.A. 1988. *Biotecnología do solo. Fundamento e perspectivas*. Brasilia: MEC – Ministerio de Educação, ABEAS; Larras: ESAL, FAEPE. 236 p.
103. Sociedad de agricultores de Chile. 2013. Boletín de Agricultura y abonos verdes. Disponible en:  
[http://www.abcagro.com/fertilizantes/abonos\\_verdes.asp](http://www.abcagro.com/fertilizantes/abonos_verdes.asp). Consultado en marzo de 2013.
104. Souza, L.; Bezerra, N.; Santos, E.; Silva, R.; Stamford, N. P. 2007. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. *Pesq. agropec. bras.* 42 (2): 207-217 p.
105. Torres, D.; del Pino, A.; Casanova, O.; Arrondo, F. 1995. Abonos verdes para maíz. *Diálogo XLIII Maíz: Sistemas de producción. Programa cooperativo para el desarrollo tecnológico agropecuario del Cono Sur*. PROOCISUR. IICA. Montevideo, Uruguay. 188p.
106. Trouvelot, A.; Kough, J.; Gianinazzi-Pearson, V. 1986. *Mesure du taux de mycorhization VA d'un systeme radicaire. Recherche de methodes*

- d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Proc. 1st Eur. Symp. on Mycorrhizae: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae, Dijón. INRA, Paris.
107. Vásquez, E.R. 2011. Contribución al tratamiento estadístico de datos con distribución binomial en el modelo de análisis de varianza. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Mayabeque, INCA, 97 p.
108. Vázquez, L.; Álvarez, J. 2011. Control ecológico de poblaciones de plagas. Instituto de investigaciones de sanidad vegetal, Ministerio de la Agricultura. Editorial CIDISAV. La Habana, Cuba. 134 p.
109. Vélez, F. 2012. Efecto de abonos verdes en la agregación y micorrización en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en un suelo de ladera de Palmira (COLOMBIA). Tesis en opción al Grado de Maestro en ciencias Agrarias. Universidad nacional de Colombia. 96 p.
110. Zea, J. L. 1993. Efecto residual de intercalar leguminosas sobre el rendimiento de maíz en nueve localidades de Centroamérica. Rev. Agronómica Mesoamericana, 4:18–22.