

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS**  
**Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE GUANTÁNAMO**  
**Facultad Agroforestal**

**MANEJO DE LA BIOFERTILIZACIÓN CON HONGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y RIZOBACTERIAS EN  
SECUENCIAS DE CULTIVOS SOBRE SUELO  
FERRALÍTICO ROJO**

**Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas**

**Aspirante: Ing. Manuel C. Riera Nelson**

**Tutores: Dr.C. Nicolás L. Medina Basso**

**Dra.C. Ma. de los Ángeles Pino Suárez**

**La Habana**

**2003**

*ES DE IMPORTANCIA PARA QUIEN DESEE ALCANZAR UNA  
CERTEZA EN SU INVESTIGACIÓN, EL SABER DUDAR A  
TIEMPO.*

*ARISTÓTELES.*

## DEDICATORIA

*A la Revolución cubana, por su obra en la educación del pueblo y darme la oportunidad de convertirme en un profesional que dedica su vida al servicio del país.*

*A mis padres y hermanos que con denodado esfuerzo y ternura me educaron e inculcaron el amor a la patria y a la libertad.*

*A mis hijos, la parte más dinámica de mi existencia, que me alientan a seguir.*

*A mi esposa por su comprensión, apoyo y cariño.*

*A la memoria de mi hermano Tulio, que siempre vive en mis recuerdos.*

## AGRADECIMIENTOS

*Deseo expresar el más sincero agradecimiento a los colectivos de trabajadores del INCA, el Centro Universitario de Guantánamo y otras instituciones, que de una forma u otra, han hecho posible la culminación de esta Tesis, y en particular :*

- A mis tutores Dr. Nicolás Medina Basso y Maria de los A. Pino Suárez, que unidos a los Doctores Martín Bertolí y Adriano Cabrera guiaron la realización del trabajo y dieron valiosos y certeros consejos, que resultaron estímulos de inapreciable valor para seguir adelante.*
- A los Doctores José Roberto Martín, Walfredo Torres, Ramón Rivera y al Consejo Científico del INCA, por sus valiosas recomendaciones, sugerencias y el arduo trabajo que realizan en la formación de Doctores en Ciencias Agrícolas.*
- Al colectivo del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de plantas, por el apoyo recibido en los diferentes grupos de trabajos de Micorrizas, Rizobacterias, Análisis químicos y Alternativas Nutricionales.*
- A la Ing. Mayelín Méndez, que en unión con los técnicos y obreros de campo constituyeron pilares importantes en la realización de los experimentos.*
- A mis hermanos y compañeros de cada instante en nuestra Casa de Postgrados, que compartimos mucho tiempo y de los cuales aprendimos y recibimos mucho apoyo, Luperio Barroso, Eduardo Pulido, Enio Utria, Abady Lóres, Orlando S. Paneque, Juan J. Silva, Tania Rodríguez, Miguel A. Ramírez, Gertrudis Pentón, Hilda Wencomo, Elizabeth Cristo, Noralis Paissan, Deyanira Rivero, Ariel de la Cruz, Alexander Miranda, Rafael Novella y Eduardo Velasco.*

## Síntesis

Se desarrolló un grupo de estudios sobre un suelo Ferralítico Rojo compactado, en áreas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, en la provincia La Habana, con el objetivo de evaluar el post-efecto micorrízico sobre las respuestas productivas de los cultivos bajo diferentes frecuencias de inoculación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y rizobacterias, así como su impacto sobre diferentes indicadores de las condiciones químicas y físicas del suelo. Para ello se llevaron a cabo 4 experimentos de campo, repetidos durante dos años, basados en diferentes secuencias en cada una de las cuales se alternaron tres cultivos diferentes, teniendo en cuenta las características de su sistema radical, las extracciones de nutrientes y los aportes de elementos al suelo. Los resultados mostraron que la mayor eficiencia del post-efecto micorrízico se logra cuando se inoculan, al menos, los dos primeros cultivos dentro de las secuencias, con lo cual aumentan el desarrollo y rendimiento de los cultivos y se estimulan, al mismo tiempo, las poblaciones de las rizobacterias coinoculadas con el hongo MA, con el consiguiente aumento de las extracciones de nutrientes por las plantas; sin embargo, las coinoculaciones realizadas solo al primer cultivo de cada secuencia condujo a la disminución en los valores alcanzados por las diferentes variables evaluadas, dada por la baja permanencia y viabilidad de los propágulos micorrízicos en el suelo, que disminuyen con el tiempo. Además, se observaron aumentos en el contenido de materia orgánica y un efecto positivo de los hongos MA y rizobacterias sobre el estado de agregación y la estabilidad de los agregados del suelo, pudiéndose prescindir de la inoculación del tercer cultivo de las secuencias, alcanzando similares resultados para las diferentes variables evaluadas. Se obtuvo una mayor eficiencia económica con la coinoculación de 2 ó 3 cultivos de cada secuencia, aunque la magnitud de este efecto estuvo determinada por las especies de cultivos incluidas en cada una.

## I. Introducción

La población mundial, que es una medida de nuestra capacidad tecnológica de preservar la vida y alimentarnos, ha crecido establemente. En los últimos 200 años el crecimiento ha sido exponencial, lo que significa que la población mundial se duplica cada 40 años (Castro 2000). Por tanto, una de las mayores preocupaciones de la humanidad lo constituye el abastecimiento alimentario, sobre todo en los países más pobres, debido a que la población crece a un ritmo acelerado, mientras que los suelos cultivables disminuyen al ritmo vertiginoso de 6,8 % en cada década (FAO, 1994). La agricultura tendrá que hacer frente a este reto, fundamentalmente, mediante el aumento de la producción en los suelos que ya se están utilizando y logrando, asimismo, el aprovechamiento más racional de suelos que sólo son marginalmente aptos para el cultivo.

La práctica de la agricultura intensiva en Cuba ha traído como consecuencia el deterioro de las condiciones físicas del suelo. La degradación de la estructura del suelo induce una reducción notable de la infiltración del agua, lo que trae consigo la escorrentía superficial y, por consiguiente, la agudización del proceso de erosión. Los suelos del tipo Ferralítico Rojo que están sobreabastecidos de fósforo y potasio, con un desbalance nutricional producto de la aplicación indiscriminada de fertilizantes minerales, ha inducido, además, variaciones en el estado físico del suelo, ya que cambios en el pH y relaciones catiónicas no óptimas traen consigo propiedades físicas desfavorables que, finalmente, contribuyen a la agudización del problema de la erosión y la contaminación del medio ambiente (Orellana y col., 1995).

En efecto, la solución de los principales problemas que afectan a los suelos agrícolas de Cuba, debe ser vista con un enfoque sistémico e integrador y no como una solución aislada, pues se concatenan factores naturales y antrópicos (Febles, 1999). Es importante indicar que la sustentabilidad de los sistemas de producción, depende, fundamentalmente, del mantenimiento de la productividad de los suelos a través del desarrollo, la restauración y el mantenimiento de las condiciones físicas, químicas y biológicas, regulada en gran medida por la capacidad de reciclaje de los recursos orgánicos y las actividades de los microorganismos, que deben ser favorecidas por las acciones de manejo que se realicen (Gomero y Velásquez, 2001).

Estos mismos autores señalan que la diversificación productiva en el espacio y tiempo es determinante para lograr el máximo reciclaje de la biomasa

producida en los diversos ecosistemas. Esta condición ecológica permite estabilizar los niveles de materia orgánica en el suelo, lograr un balance adecuado de nutrientes y garantizar una abundante población de los microorganismos que regulan las actividades biológicas en el suelo.

Para evitar el deterioro de la fertilidad del suelo, la agricultura intensiva debe tender a combinar la utilización de adecuadas cantidades de fertilizantes minerales con productos de origen microbiano, dado que los procesos microbiológicos tienen la ventaja de ser tecnologías "limpias", no contaminantes del ambiente (Martínez, 1994). Ante la realidad anterior, en los últimos años se han venido planteando diferentes medidas y nuevas metodologías de producción agrícola que permiten contrarrestar las consecuencias ecológicas perjudiciales de las prácticas agrícolas modernas. Por tanto, resulta importante la creación de agroecosistemas diversificados de producción, el manejo ecológico de plagas, enfermedades y malezas en los cultivos, el reciclaje de materiales orgánicos y la utilización de la fijación biológica de nitrógeno.

En Cuba se han realizado diferentes estudios que han demostrado la posibilidad del uso de diferentes microorganismos como alternativa biológica para la nutrición de las plantas, destacándose entre ellos las bacterias nitrofixadoras, y otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal así como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Estos microorganismos son considerados como insumos biológicos de enorme potencial en la agricultura, gracias a sus efectos positivos sobre la adaptación y crecimiento de una gran variedad de cultivos. Además, los hongos micorrízicos son componentes clave para el desarrollo de la biota del suelo, por su gran capacidad de interacción con diferentes especies microbianas, a la vez que pueden modificar muchos aspectos de las propiedades físicas en la zona rizosférica (Martínez y Hernández, 1995).

Todos esos efectos modifican los patrones de colonización de la raíz micorrizada, donde se desarrollan procesos biológicos que mejoran las condiciones de los suelos para el desarrollo de las plantas, aspectos muy importantes para el establecimiento de una agricultura sostenible y el funcionamiento del ecosistema (Barea y col., 2002). Por lo tanto, la aplicación eficiente de hongos MA y rizobacterias en el manejo futuro de la agricultura dependerá, en gran medida, de nuestra habilidad para identificar las funciones específicas que realizan esos microorganismos dentro de cada agroecosistema particular e integrar esos descubrimientos dentro de la estrategia de manejo (Shreiner y Jastrow, 1995), donde la inclusión de las respuestas del suelo a la evaluación de la eficiencia de los microorganismos es una necesidad.

En la actualidad muchas investigaciones enfatizan en la importancia de las repuestas de los microorganismos al ambiente donde se desarrollan, pero dan menos valor a las transformaciones que realiza la biota edáfica en el medio circundante para mejorar sus características (Jones y col., 1997). Internacionalmente, se han realizado algunos trabajos relacionados con la influencia de los antecedentes culturales en las respuestas de las plantas a la micorrización (Arihara y Karasawa, 1999; Bearden y Petersen, 1999; Parke y Kaeppler, 2000; Karasawa y col., 2001), con la influencia de los hongos MA sobre las propiedades físicas de los suelos (Miller y col., 1995; Bearden y Petersen, 1999; Miller y Jastrow, 2000; Rillig y Wright, 2000) y, en los últimos años, con el descubrimientos y caracterización de una glicoproteína llamada “glomalina”, así como sobre sus efectos en la formación y estabilidad de los agregados del suelo (Wright y Upadhyaya, 1998; Wright y col., 2001; Rillig y Steimberg, 2002), pero la mayoría de estos estudios se han desarrollado en zonas templadas, bajo condiciones controladas y semi-controladas.

En Cuba, sólo los trabajos de Ruíz (2001) abordan la permanencia de los propágulos de hongos micorrízicos en rotaciones de cultivos y su influencia sobre los rendimientos de plantas productoras de raíces y tubérculos en suelos Pardos. Estos limitados antecedentes conducen a una carencia de información acerca del impacto del pos-efecto micorrízico en los cultivos en secuencias y sobre las características del suelo en condiciones de campo en ambientes tropicales.

La elucidación de las estructuras jerárquicas de preferencias mutuas que se establecen entre las raíces, hongos micorrízicos y rizobacterias puede facilitar el manejo de la biota edáfica y aumentar la estabilidad del sistema suelo – planta (Andrade y col., 2001). La pérdida de la capacidad de colonización micorrízica por las plantas también puede resultar en pérdida de los importantes beneficios que proporcionan estos hongos y reduce la capacidad de las poblaciones para colonizar otros cultivos en las secuencias. (Parke y Kaeppler, 2000). Los trabajos desarrollados por Fernández (1999) y Joao (2002) han demostrado la especificidad suelo – HMA, donde el tipo de suelo es el factor fundamental para definir la especie y/o cepa más eficiente para una determinada condición edafoclimática.

Por otra parte, en los cultivos que se multiplican mediante semillas agámicas, los que resultan difíciles de inocular por recubrimiento, el manejo adecuado de la frecuencia de inoculación con hongos MA puede convertirse en un factor clave para el correcto establecimiento de las especies vegetales a incluir dentro de un sistema efectivo de manejo sostenible de la producción agrícola, mediante el aprovechamiento del post-efecto micorrízico.

A partir de las consideraciones anteriores, resulta de gran interés dar un tratamiento holístico al estudio de los diferentes fenómenos relacionados con la aplicación de alternativas nutricionales biológicas en la agricultura, sobre todo cuando se inoculan hongos micorrízicos arbusculares que, por su papel destacado dentro de la interacción “suelo-planta-microorganismos”, determina la necesidad de incluir la micorrización al proyectar el manejo sostenible de los agroecosistemas (Rivera y Fernández, 2003).

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos se formuló la siguiente HIPÓTESIS DE TRABAJO:

**“La aplicación frecuente de cepas efectivas de hongos micorrízicos arbusculares, combinadas con rizobacterias, permite disminuir las inoculaciones sucesivas en secuencias de cultivos, al incrementar la actividad y cantidad de propágulos micorrizógenos en los suelos, como post-efecto micorrízico, sin afectar el desarrollo y rendimientos de las plantas y mejorando, al mismo tiempo, las condiciones productivas del medio edáfico.”**

Para demostrar dicha hipótesis, se ejecutaron varios experimentos de campo dirigidos a alcanzar los objetivos que se relacionan a continuación:

- 1) Evaluar el post-efecto micorrízico sobre la respuesta productiva de las plantas al variar la frecuencia de inoculación con hongos MA y rizobacterias en diferentes secuencias de cultivos.
- 2) Determinar las influencias del tipo de cultivo en cada secuencia y de la frecuencia de inoculación con hongos MA y rizobacterias sobre algunos indicadores de colonización radical y población rizosférica por dichos microorganismos.
- 3) Establecer el papel específico de las secuencias de cultivos y la frecuencia de inoculación con hongos MA y rizobacterias sobre el comportamiento de algunos índices químicos y físicos de la fertilidad del suelo y la extracción de nutrientes por las plantas.
- 4) Evaluar la factibilidad económica del aprovechamiento del post-efecto micorrízico en diferentes secuencias de cultivos.

## II. Revisión de la Literatura

### 2.1 Sistemas de cultivos.

En la época actual muchos agricultores se enfrentan con rendimientos declinables, infecciones elevadas de malezas, enfermedades e insectos, y un notable deterioro de la fertilidad así como de la estructura de los suelos. Esta situación se atribuye a varios factores y uno de los más importantes ha sido la siembra consecutiva del mismo cultivo por muchos años o la siembra de la misma secuencia de cultivo cada verano o cada invierno.

Todos los sistemas de producción agrícola deben estar dirigidos a lograr el máximo de rendimiento por unidad de superficie y en el menor tiempo posible, sin afectar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo de forma irreparable, lo cual se logra con la inclusión de la rotación de cultivos, práctica desarrollada actualmente en muchos países del mundo. Con los monocultivos rotativos se favorece la proliferación masiva de organismos dañinos, requiriéndose, con tendencia creciente, la aplicación de plaguicidas.

El monocultivo posee los inconvenientes de elevar el riesgo de pérdida total de los rendimientos, eleva los costos de producción por exceso de insumos, provoca desbalances en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, limita la diversidad y, como consecuencia, pone en peligro el equilibrio ecológico. Este sistema es considerado la base ecológica de la aparición de plagas y de la inestabilidad de la agricultura moderna, donde se crean condiciones muy favorables para el desarrollo de insectos fitófagos que se alimentan de la planta en cuestión y se afecta la competencia de los enemigos naturales, entre otros mecanismos naturales de regulación.

En un campo donde predomina una sola especie de cultivo se crean condiciones para que algunos organismos se conviertan en plagas. Según Pérez y col. (1995), en estos ambientes tan simplificados y poco diversos existe abundante fuente de alimento, abrigo, lugares de apareamiento y otros factores ambientales que favorecen la colonización y permanencia de insectos fitófagos, debido a que se satisfacen sus necesidades vitales. Por otro lado, se deprime la inducción de controles biológicos eficientes como consecuencia de las prácticas culturales utilizadas y las limitadas posibilidades de encontrar los recursos necesarios (néctar, polen, abrigo) para una respuesta funcional efectiva por parte de los enemigos naturales.

Hernández, A. y col. (1998) refieren que uno de los elementos que determinan los elevados costos de producción en el monocultivo es el control de

malezas. Este aspecto representa el 10 % ponderado de los costos de producción, al reducir el rendimiento del cultivo y la calidad del grano.

Otro asunto que ha cobrado atención por los investigadores, según Flores (1984), es el referido al deterioro de las propiedades físicas del suelo. Este aspecto influye de forma directa en los costos de producción, al obstaculizar el crecimiento de las raíces de las plantas e, indirectamente, al reducir el contenido de oxígeno de los suelos, alterando así el desarrollo de la flora microbiana.

La sucesión de cultivos diferentes en un mismo terreno contribuye a mantener el equilibrio de los nutrientes del suelo y aumenta la fertilidad. Se plantea que la economía general de la explotación agrícola se beneficia como consecuencia de la diversificación de los cultivos y de las posibilidades de salida de los distintos productos. Ello contribuye a una mejor y más racional utilización de los medios de producción, dígame semillas, abonos, insecticidas y máquinas (Hernández, T., 1997; 1999)

Pohlan y col. (1995) refirieron que, dada la gran heterogeneidad en los cultivos y uso de los granos básicos de los países de Centroamérica, la rotación es una oportunidad para especies tan importantes como el arroz, el maíz, el sorgo, el trigo, la cebada y la avena. Estos sistemas son necesarios en la agricultura, puesto que evitan que al cultivar siempre las mismas plantas en el mismo terreno sucedan incompatibilidades entre estas, a causa de las toxinas especiales que cada una emite. Es conocido que ni aún en los terrenos ricos se deben cultivar las mismas especies cada año, pues ello condiciona un agotamiento acelerado de los suelos con la consecuente disminución de los rendimientos, aparición de vegetación espontánea y aumento en la incidencia de plagas y enfermedades. Un ejemplo fehaciente de este fenómeno puede observarse en el caso del cultivo del arroz. Al respecto, los mismos autores expresan que la rotación de cultivos es una de las fuentes gratuitas de la agricultura. Su manejo adecuado puede mantener o mejorar la fertilidad del suelo, frenar el desarrollo epidémico de plagas, enfermedades y plantas indeseables y aprovechar el efecto beneficioso de la alelopatía, como es el caso del cultivo del girasol intercalado en la yuca y en rotación con el arroz.

Según Primavesi (1990) y Da Costa (1991), los beneficios de la rotación de cultivos están asociados a los siguientes puntos básicos:

- Cobertura y protección del suelo
- Mejora de sus condiciones físicas, químicas y biológicas
- Regulación de la temperatura y humedad del suelo

- Incremento de su contenido en materia orgánica, así como del aporte, reciclaje y movilización de nutrientes
- Combate de nemátodos, plagas y enfermedades
- Control de plantas invasoras

La rotación de cultivos influye en características físicas de los suelos tales como la estructura, la capacidad de retención del agua, la densidad, las velocidades de infiltración y aireación, dependiendo estos efectos de la calidad, cantidad, tipo de manejo, factores climáticos y de las características intrínsecas del tipo de sustrato (Cancio y col., 1989).

El efecto rotacional del cultivo se refiere al hecho de que la mayoría de las rotaciones aumentarán los rendimientos de granos a niveles superiores a los obtenidos mediante cultivo continuo bajo similares condiciones. Se ha demostrado la existencia de este efecto en rotaciones con o sin leguminosas. Por ejemplo, maíz después de trigo da mayores rendimientos que maíz continuo, con cantidades similares de fertilización. El aumento en el rendimiento después de una leguminosa es, generalmente, mayor del que se esperaría de la cantidad de nitrógeno integrado. De hecho, el rendimiento en granos después de una leguminosa es a menudo de 10 a 20 % superior al obtenido mediante cereal continuo, independientemente del fertilizante aplicado (García, 1997).

Se piensa que son muchos los factores que contribuyen al efecto rotacional, incluyendo mayor humedad del suelo, mayor control de plagas y enfermedades y mejor disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, se ha llegado al consenso de que el componente más importante en este sentido está relacionado con los beneficios obtenidos de un mejor control de plagas y enfermedades durante la rotación. El aumento de la materia orgánica del suelo, especialmente en rotaciones que integran rastrojos, puede ser la base para el mejoramiento de las características físicas del suelo, lo cual puede explicar en parte los aumentos en el rendimiento. Ciertos cultivos con raíces profundas pueden utilizar nutrientes ubicados más profundamente en el perfil de suelo y, como resultado de dicho proceso, exportan los nutrientes a la superficie, volviéndolos disponibles para cultivos de raíces más superficiales, si los rastrojos no se sacan del terreno.

El control de plagas y enfermedades se logra principalmente a través del cambio estacional de la fuente de alimento (el cultivo), el que usualmente impide el establecimiento de niveles productivos de plagas y enfermedades. A medida que el daño a las raíces se reduce, las raíces más sanas están en mejores condiciones para absorber nutrientes en el suelo, lo que puede reducir las dosis de fertilizantes necesarias. Los sistemas de raíces sanos también pueden absorber más

eficientemente, reduciendo la probabilidad de lavado de nutrientes desde la zona de raíces.

Las leguminosas en una rotación pueden incorporar nitrógeno atmosférico al suelo, pero la cantidad fijada va a depender de la especie en cuestión y del sistema de manejo; sin embargo, prescindiendo del fertilizante nitrogenado, el nitrógeno fijado por las leguminosas puede asegurar altos rendimientos de granos (García, 1997).

Las gramíneas se han destacado por la eficiencia en la formación de agregados a través de la acción directa e indirecta de las raíces; es por ello que uno de los métodos más adecuados para mejorar la estructura de un suelo es mediante la mezcla de una gramínea con vigoroso sistema radical, en constante renovación, y una leguminosa que acelere la descomposición de los residuos vegetales. De acuerdo con Lizhi (1991), esta mezcla incrementa la relación C:N del material añadido y se reducen los índices de descomposición, lográndose incrementar rápidamente el contenido de materia orgánica del suelo.

Cass y col. (1994) demostraron que la siembra de pastos durante ocho años condicionó incrementos en los contenidos de nitrógeno total y de materia orgánica en el suelo y disminuyó la densidad aparente debido a la reorganización de los minerales y los constituyentes orgánicos en los suelos más compactados.

Huang (1991) explica que cuando se utiliza una leguminosa en rotación con el arroz, el beneficio que esta proporciona a las propiedades físicas del suelo es una de las causas del incremento de los rendimientos. Refiere, además, que, debido a esta alternativa, se favorece la granulación del suelo, ya que se logra mayor estabilidad de los agregados. La conservación del suelo radica, en gran parte, en el mejoramiento de sus propiedades físicas.

Alfonso y col. (1994), al utilizar las asociaciones de maíz con leguminosas como abonos verdes combinados con el laboreo mínimo, obtuvieron una alternativa viable para el mejoramiento de las propiedades físicas de suelos Oxisoles (Sur de La Habana) y Ultisoles (San Juan y Martínez, en Pinar del Río) dedicados al cultivo del frijol. En coincidencia, García (1997) obtuvo resultados muy positivo al intercalar diferentes especies de leguminosas en el cultivo de la malanga, lo que condicionó la disminución de la densidad aparente del suelo, el incremento significativo de la humedad natural y la tendencia al incremento de la porosidad total.

Por estas razones es sumamente importante que, en lo posible, las rotaciones incluyan cultivos como maíz, sorgo, girasol y algodón que producen grandes cantidades de residuos con valores altos de C:N y que no son fácilmente

descompuestos (Somda y col., 1991). En tal sentido, Cancio y col. (1989) y Primavesi (1990) refirieron que el elemento calcio es movilizado por leguminosas como el lupino (*Lupinus* sp.) y la soya (*Glycine max.*), mientras que el fósforo y el potasio son movilizados especialmente por plantas de porte alto como el sorgo (*Sorghum vulgare*). Randrianjafy (1994) señaló que la cáscara del girasol constituye una fuente apreciable de abono potásico.

Barber (1994) plantea que el maíz y el sorgo, en rotación con la soya, requieren de menos fertilizante para obtener rendimientos máximos. Al mismo tiempo, Díaz (1998) demostró la factibilidad del uso de la soya en rotación con el arroz, por la estabilidad del rendimiento en ambos cultivos y el efecto positivo de esta leguminosa en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Díaz (1990) refirió que, tanto el girasol como el sorgo y otros cultivos pueden integrar sistemas de rotación por los beneficios que reportan al rendimiento del arroz y a las propiedades físicas de los suelos.

## **2.2 Manejo de la fertilidad del suelo.**

### **2.2.1 Generalidades**

La tendencia actual hacia la reducción o eliminación de los barbechos, para el establecimiento de sistemas de producción con uso continuo de suelo, implica una dependencia creciente de los insumos industriales agrícolas para mantener los niveles productivos. Bajo estas circunstancias, se requiere de una mayor utilización de energía adicional para alcanzar rendimientos agrícolas similares a los obtenidos con los periodos de barbecho necesarios, tendencia que va en detrimento del número de especies que intervienen en la producción, tanto para las especies cultivadas dentro de la parcela como para la vegetación espontánea, que constituye la composición florística inicial de la sucesión secundaria.

El reaprovisionamiento de la fertilidad del suelo es uno de los principales factores que repercute en los beneficios asociados al mejoramiento de la producción, incrementando la cobertura del suelo y aumentando la actividad biológica del mismo (Sánchez y col., 1997). Este reaprovisionamiento puede lograrse mediante el uso de fuentes de nutrientes tanto minerales como orgánicas y la baja aplicación de estas fuentes combinadas es el mayor impedimento biofísico para incrementar la producción de los cultivos. Sin embargo, en las zonas donde la pérdida de fertilidad es alta y se producen pocas cantidades de residuos de cultivos y abonos orgánicos, los fertilizantes se convierten en la fuente principal para el reestablecimiento de los nutrientes en los suelos, pero antes de su aplicación deben estudiarse las formas y métodos de aplicación así como el

beneficio potencial que se espera con el uso de los mismos (Bekunda y col., 1997).

Guiller y col. (1997) plantearon que, en zonas semiáridas, la fertilidad del suelo sólo puede mantenerse mediante el empleo eficiente de materiales orgánicos combinados con fertilizantes minerales y el uso de rotaciones de cultivos con leguminosas. No obstante, una adecuada fertilización contribuye a una mayor producción de biomasa, que protege al suelo de la erosión y proporciona cantidades de residuos importantes para mejorar la agregación del suelo. Todo el fósforo orgánico, incluido tanto en las estructuras biológicas como en tejidos vegetales, se convierte en inorgánico en un periodo de uno a tres años (Fardeau, 1999).

### **2.2.2 Degradación de la fertilidad del suelo.**

Para el año 2020, la degradación de los suelos puede representar una grave amenaza para la producción de alimentos y los medios de vida de la población rural, particularmente en las zonas pobres y densamente pobladas del mundo en desarrollo. La degradación de los suelos ocurre de diferentes maneras, entre las cuales cabe citar el agotamiento de sus nutrientes, la salinización, la contaminación por productos químicos, la erosión del suelo, la degradación vegetativa como resultado del pastoreo excesivo y la tala de bosques. Todos esos tipos de degradación reducen la capacidad productiva de los suelos y los rendimientos potenciales (Scherr y Yadav, 1998). Según Cannel y Hawes (1994), la materia orgánica del suelo es, probablemente, una de las características más relacionada con la calidad del suelo, debido a su influencia sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo.

Otro de los problemas relacionados con la pérdida de fertilidad del suelo radica en que considerables cantidades de elementos nutrientes son depositados en los horizontes más profundos mediante el proceso de lavado. En tales condiciones, se requiere arar las tierras a mayores profundidades para devolver dichos nutrientes a la superficie, poniéndolos al alcance de las plantas. Darmody y Norton (1994), en un estudio micromorfológico, concluyeron que la fertilización y la aplicación de encalado tuvo pocos efectos sobre las propiedades de los agregados; sin embargo, su estabilidad y la cantidad de macroporos del suelo disminuyeron con el aumento de la intensidad de laboreo.

La biodiversidad se reduce considerablemente en la agricultura convencional puesto que el suelo permanece desnudo durante largos periodos de tiempo, sin suministrar alimento ni cobijo para gran parte de la fauna en periodos

críticos de su desarrollo. Por el contrario, la agricultura de conservación, al dejar residuos vegetales en la superficie del suelo, proporciona condiciones adecuadas para el desarrollo de numerosas especies (aves, pequeños mamíferos, reptiles, invertebrados del suelo tales como lombrices o predadores de plagas). Con los sistemas de agricultura de conservación se reduce en gran medida la erosión del suelo (más del 90% en el caso de siembra directa / no laboreo y más del 60% en el laboreo reducido), lo que se traduce en una mejor calidad de las aguas superficiales debido a la reducción de los sedimentos, lo que, además, conlleva a una disminución estimada de más del 70% de los herbicidas transportados, más del 85% de los óxidos de nitrógeno, el 65% de los fosfatos solubles y reduce en un 69% las pérdidas de agua por escorrentía en comparación con áreas en donde se llevan a cabo labores de suelo convencionales. Todo lo anterior representa en su conjunto una mejora significativa de la calidad de las aguas superficiales.

La continua labranza convencional produce degradación física, manifestada a través de la estabilidad y tamaño de agregados (Michelena y col., 1996). La estabilidad de agregados es uno de los indicadores utilizados para evaluar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas (Orellana y Pilatti, 1999). En este sentido, Gutiérrez y col. (1999) encontraron que los índices físicos de suelo dependen principalmente del sistema de labranza más que de las secuencias de cultivos. Además, observaron una mayor cantidad de agregados más estables cuando se empleó el monocultivo en algodón con labranza mínima, correspondiendo a los suelos de tipo limosos finos la mayor pérdida de estabilidad de agregados.

### **2.2.3 Conservación y mejoramiento de la fertilidad del suelo.**

De acuerdo con Bunch (1995), la gran mayoría de los suelos pueden recuperarse transformándolos en suelos altamente fértiles aplicando los siguientes 5 principios: aplicar nutrientes al suelo, maximizar la producción de materia orgánica, mantener el suelo cubierto, realizar la siembra directa y mantener la biodiversidad.

Debido al uso excesivo de maquinaria pesada y a la aplicación intensiva de fertilizantes y pesticidas en el pasado, los suelos de Cuba sufren de compactación y falta de materia orgánica. El monocultivo expansivo ha dejado susceptible a la erosión a una gran superficie de suelo agrícola. Dado este escenario, y entendiendo que el suelo es el recurso más importante para la agricultura, los científicos están desarrollando sistemas de manejo y conservación de suelos basados en el uso de labranza mínima, rotaciones, abonos orgánicos, biofertilizantes y uso de leguminosas como abono verde y coberturas. (Rosset y Altieri, 2001).

#### **2.2.4 Manejo de los residuos de cultivos.**

El manejo de los residuos vegetales puede convertirse en un factor importante en la agricultura tropical, aún cuando sean aplicados los fertilizantes inorgánicos, ya que mejoran la retención de humedad, las propiedades físicas y e incrementan la biomasa microbiana. (Miller, 1990). Según este autor, la cantidad y eficiencia de la mineralización de los nutrientes contenidos en los residuos de cosechas, mediados por la biomasa microbiana del suelo, son factores clave para determinar la disponibilidad de nutrientes para los cultivos. También es aceptado que la fertilidad, tanto en los ecosistemas agrícolas como en los naturales, depende de la eficiencia del ciclado de nutrientes entre las plantas, los microorganismos y la materia orgánica del suelo.

Los residuos vegetales con bajos niveles de nitrógeno tienen efectos directos sobre las propiedades físicas del suelo. Por ejemplo, en California, de acuerdo con Miller (1990), se demostró que cuando la cebada fue incorporada en una etapa avanzada, la tasa de infiltración aumentó en un 60 % y la concentración de nitrógeno disminuyó de 2,7 a 1,2 %. En un suelo más permeable, el residuo de un cultivo de maíz (0,7 % de N) incrementó doblemente la infiltración comparado con el cultivo de cobertura de caupí (2,5 % de N). Asimismo, después de tres temporadas de cultivo de cobertura con pasto de Sudán (1,3 % de N), alternando con cultivos de altos rendimientos durante los inviernos, los resultados mostraron un 45 % de incremento en la infiltración, comparados con el barbecho.

La biomasa microbiana constituye un reservorio de materia orgánica potencialmente disponible, que toma nutrientes de los residuos de plantas preferiblemente que de las fuentes inorgánicas (Ocio y col., 1991). De esta manera, la composición y características de los residuos determinarán la disponibilidad de nutrientes para el cultivo que se desarrolla y su ciclo posterior. Algunos factores como la relación C:N, porcentaje de sustancias de rápida descomposición y contenido de lignina tienen un importante efecto sobre la absorción y la posterior mineralización de los nutrientes derivados de los residuos (Anderson y Liberta, 1992).

La relación C:N debe ser tomada en consideración en el momento de optar por la especie a cultivar. En caso de que el cultivo económico exija un suministro inmediato de N será conveniente utilizar plantas con relación C:N baja; de ser alta esta relación, exigirá la aplicación de N mineral. También es posible efectuar una combinación de abonos, utilizando uno con alta relación C:N y otro con baja, obteniendo así un material de relación intermedia (Calegari, 1995).

Por otra parte, Muller y col. (1993), citados por García (1997), encontraron que la concentración de lignina en materiales de plantas fue mucho mejor predictor de la velocidad de descomposición de los residuos de plantas que las concentraciones de N. Palm y Sánchez (1990) indicaron que el mejor predictor de N mineralizado en 8 semanas para 10 leguminosas tropicales y paja de arroz fue la relación polifenol:N en el residuo. Estos autores encontraron, además, que el N y la concentración de lignina en los materiales de plantas no se correlacionaron con la cantidad de N mineralizado. En este sentido, la lignina y el polifenol reducen la velocidad de mineralización del N porque la lignina se degrada a compuestos fenólicos que presentan combinaciones con las proteínas para formar polímeros húmicos que resisten la mineralización.

De acuerdo con Holderbaum (1990), los efectos de los residuos de plantas sobre la respuesta de los cultivos y el suelo al fertilizante nitrogenado, varían con la composición química, el método de la aplicación de los residuos de plantas y las condiciones de suelo y clima. Otros autores suman a estos factores indicadores tales como la cantidad y calidad del material incorporado (composición), la temperatura, la humedad, la lluvia, la presión osmótica, la tensión superficial, la viscosidad, el pH del suelo, los nutrientes asimilables, la naturaleza de los microorganismos presentes y la fauna activa del suelo (Haggar, 1993; Ajwa y Tabatabai, 1994).

La mineralización es el proceso más importante del ciclo del nitrógeno ya que determina la concentración de este elemento en forma asimilable. También constituye el mecanismo primario de diferentes procesos de pérdida del nutriente, tales como el lavado y la volatilización; además, la mineralización es el proceso mediante el cual el nitrógeno en forma orgánica pasa a forma amoniacal y con posterioridad a nitrato. Los factores que determinan las tasas de mineralización del nitrógeno son la temperatura, la relación C:N, el pH del suelo, la mineralogía de las arcillas y la humedad. (Ajwa y Tabatabai, 1994).

La incorporación al suelo de los residuos de los cultivos, asumiendo que no existan pérdidas durante el proceso, permite, teóricamente, reciclar el 40-50 % del nitrógeno exportado, un 25-40 % del fósforo y un 70 % del potasio. En los cereales, se estima que un máximo de 35 % del N absorbido, el 30 % de fósforo y entre 35 y 60 % de potasio es reciclado a través de los residuos. (FAO, 1993). Las leguminosas como la soya, cuando son cosechadas como grano, proveen al suelo con  $40 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  de nitrógeno en suelos del trópico húmedo. Tales niveles de fijación requieren altas disponibilidades de fósforo.

## **2.3 La biofertilización.**

### **2.3.1 Generalidades.**

El suelo constituye un medio ideal para el desarrollo de la vida microbiana; las propiedades físicas y químicas en su conjunto han creado las condiciones ecológicas que permiten incubar en su interior un elevado número de microorganismos con requerimientos nutricionales y propiedades fisiológicas muy diferentes (Fernández y Novo, 1988).

La mayor parte de la biota del suelo se encuentra en la rizosfera. La investigación actual sobre la biota microbiana y fuentes de materia orgánica en agroecosistemas, va dirigida a descubrir cómo la producción y las transformaciones pueden ser mejor entendidas y manejadas a fin de sincronizar la liberación de nutrientes con la absorción de dichos elementos. Diversos ecólogos y agrónomos aseguran que las prácticas agrícolas que toman ventaja de la actividad microbiana del suelo son más eficientes que las prácticas convencionales desde el punto de vista de la utilización de la energía y de los nutrientes (Novo, 2002).

Los microorganismos son aplicados a los suelos para desempeñar funciones específicas que beneficien los índices de productividad de las plantas, como resultado del aumento de la toma de agua y nutrientes, la fijación del nitrógeno, la solubilización de minerales, la producción de estimuladores del crecimiento vegetal y el biocontrol de patógenos.

Martínez (1994) planteó que los biofertilizantes incluyen todos los recursos biológicos que estimulan el desarrollo de los cultivos agrícolas mediante transformaciones de elementos o compuestos que se encuentran en formas no aprovechables, de manera que se conviertan en formas que puedan ser utilizadas mediante la acción de los microorganismos o de asociaciones microorganismos - plantas.

Mayea (1995) señala que los microorganismos utilizados como biofertilizantes tienen un triple papel como suministradores de nutrientes, de fitohormonas y como antagonistas de hongos fitopatógenos. En concordancia, Martínez y Hernández (1995) se refirieron a las ventajas que producen estos microorganismos, algunas de las cuales se relacionan a continuación:

- Incrementan los procesos microbianos y las plantas se benefician en breve tiempo.
- Consumen escasa energía no renovable.
- Son productos "limpios" que no contaminan el medio ambiente.

- Pueden mejorar la eficiencia de los fertilizantes minerales.
- Producen sustancias activas estimuladoras del crecimiento vegetal.
- Actúan sobre diversos microorganismos fitopatógenos, controlándolos.

De acuerdo con Fernández (1997), el objetivo de la aplicación de los biofertilizantes es contribuir a mejorar la calidad y productividad de los cultivos, mediante la sustitución total o parcial de los fertilizantes minerales e introducir los mismos, unidos a los abonos orgánicos, como tecnologías para producir una agricultura orgánica, ecológica y sustentable.

Es importante señalar que, en estudios relacionados con la biofertilización, la caracterización la rizosfera del cultivo es de gran importancia, ya que la misma permite seleccionar las cepas más fuertemente atraídas hacia los exudados del cultivo en estudio y por tanto, permiten obtener un biofertilizante con actividad estimuladora del crecimiento vegetal.

### **2.3.2 Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA).**

Los hongos micorrízicos arbusculares, presentes en cerca del 80 % de los cultivos agrícolas constituyen uno de los biofertilizantes que deben ser considerados en el diseño de los diferentes sistemas agrícolas, pues además de ser componentes inseparables de los agro-ecosistemas, con diferentes funciones en las plantas, pueden constituir sustitutos biológicos de los fertilizantes minerales (Johnson y col., 1992).

La utilización de los hongos micorrízicos como alternativa biológica no implica que se pueda dejar de fertilizar, sino que la fertilización se haga más eficiente y puedan disminuirse las dosis a aplicar, al incrementar el porcentaje de absorción de los nutrientes por las plantas (Walker y col., 1990).

Los beneficios que producen las asociaciones micorrízicas arbusculares sobre el crecimiento y rendimiento de las plantas resulta de gran importancia, particularmente en los suelos tropicales deficientes de fósforo asimilable y donde el potencial de explotación de estos es mucho mayor que en regiones de clima templado (Sieverding, 1991). Los beneficios reportados de las hongos MA sobre el crecimiento y la nutrición de la mayoría de los cultivos agrícolas ha provocado que, en la última década, se haya incrementado su estudio en los principales cultivos económicos.

La inoculación de las plantas con hongos micorrízicos provoca, de forma general, un marcado incremento en los procesos de absorción y traslocación de

nutrientes tales como: P, N, K, Ca, Mg, Zn, Cu, B y Mo (Marschner y Dell, 1994; Koide, 2000; Hernández, G. y col., 2002). Se han planteado razones adicionales, una de las cuales se refiere al hecho de que, en las proximidades de la raíz, las hifas y los pelos radicales (la parte más importante de la raíz en la absorción) siguen modelos diferentes de crecimiento; las hifas crecen paralelas a la raíz y los pelos radicales lo hacen perpendicularmente, lo que implica que la absorción de fósforo por unidad de superficie sea mayor en el caso de las hifas (Marschner, 1998 ).

Los hongos micorrizicos poseen la capacidad de emplear tanto  $\text{NH}_4^+$  como  $\text{NO}_3^-$ . Sus efectos son mayores en la absorción de amonio, ya que, en comparación con las raíces, son capaces de absorberlo a concentraciones más bajas, lo asimilan rápidamente y lo translocan a las plantas, aumentando la eficiencia en la extracción y los contenido de nitrógeno en las mismas (Baath y Spokes, 1989).

### **2.3.2.1 Papel de las micorrizas en ecosistemas naturales y agrícolas.**

Según diferentes autores:

1. Incrementan el abastecimiento de nutrientes para las plantas por la exploración de un volumen mayor de suelo (Thompson, 1994).
2. Incrementan el abastecimiento de nutrientes por la absorción de formas de elementos que normalmente no podrían ser asimilables por las plantas.(Morin y col., 1999).
3. Algunas especies tienen la capacidad de descomponer compuestos fenólicos en suelos, los cuales pueden interferir la absorción de nutrientes (Bending y Read, 1997).
4. Su colonización proporciona protección a las plantas contra hongos parásitos y nemátodos (Newsham y col., 1995; Little y Maun, 1996; Cordier y col., 1998).
5. Se han reportados beneficios no nutricionales a las plantas debido a cambios positivos en las relaciones hídricas, niveles de fitohormonas, asimilación de carbono, etc., pero estos son difíciles de interpretar (Miller y col., 1994; McGonigle y Miller, 1996; Miller y col., 1997).
6. Pueden ocurrir transferencias de nutrientes a través de los micelios conectados entre plantas de diferentes especies, lo que reduce la competencia entre ellas y contribuye a la estabilidad y diversidad del ecosistema (Simard y col., 1997).

7. Los nutrientes pueden ser transferidos desde las plantas muertas hacia las plantas en crecimiento (Eason y col., 1991; Shreiner y col., 1997).
8. Las hifas del hongo juegan un importante papel en el ciclado de nutrientes en el suelo, ya que evitan pérdidas en el sistema, especialmente cuando las raíces pierden su actividad, y por la adquisición de nutrientes desde los hongos saprofiticos (Lindahl y col., 1999).
9. Las hifas constituyen conductos por donde se transportan compuestos carbonados desde las raíces de las plantas hacia otros organismos del suelo que están involucrados en los procesos del ciclado de nutrientes, cooperando con otros organismos en la descomposición.
10. Los componentes estructurales de estos hongos constituyen una fuente de alimento para invertebrados y otros organismos del suelo (Lawrence y Milner, 1996; Janos y col., 1995; Mcilwee y Johnson, 1998).
11. Influyen sobre los niveles de las poblaciones microbianas y la producción de exudados en la micorrizosfera e hifosfera (Olsson y col., 1996; Andrade y col., 1998).
12. Las hifas contribuyen al mejoramiento de la estructura del suelo, por su acción mecánica sobre la agregación (Degens y col., 1994) o por sus secreciones, tales como la glomalina (Wright y Upadhyaya, 1998).
13. Contribuyen al almacenaje del carbono en el suelo al alterar positivamente la calidad y cantidad de la materia orgánica (Rillig y col., 2001).
14. La diversidad de especies de hongos MA constituye un bio-indicador de la calidad ambiental.

### **2.3.2.2 Los cultivos y el manejo de las micorrizas.**

La supervivencia de las cepas de hongos MA inoculadas al suelo y su durabilidad en el tiempo dentro de un sistema de rotación de cultivos ha sido poco investigada a escala mundial, situación que ha ocurrido también para el caso de las prácticas de manejo de los cultivos con vistas al estudio de la conservación de las micorrizas nativas o inoculadas. Primavesi (1990) señala que la diversidad de la microflora del suelo se consigue con la rotación de cultivos.

Johnson y col. (1991) mantienen la hipótesis de que las comunidades de hongos en el suelo cambian durante las sucesiones de cultivo y que esos cambios están relacionados con la especie de planta que reemplaza y los niveles de nutrientes. Además, plantean que hay una estrecha relación sucesional entre las propiedades del suelo, la productividad de las plantas y la densidad micorrizada medida por la colonización y el conteo total de esporas.

Diversas investigaciones han demostrado que también existe una estrecha relación entre los patrones de plantas y la biomasa microbiana propia a la naturaleza recíproca de los ciclos de carbono y nitrógeno (Zak y col., 1990). Estos resultados sugieren que existe una relación concomitante entre las propiedades del suelo, la productividad de las plantas y la densidad de colonización.

Comúnmente, los suelos poseen más de una especie de hongos MA. El desarrollo de estas especies varía con el tipo y profundidad del suelo, la estacionalidad y la vegetación presente en la cobertura. La dinámica de la colonización de las raíces por especies individuales dentro de una población no ha sido adecuadamente estudiada. La menor o mayor perturbación en las plantaciones agrícolas y/o ecosistemas naturales pueden conducir a marcados cambios en la formación de micorrizas.

Las plantaciones micorrizadas parecen ser capaces de ajustarse a los cambios graduales del medio ambiente sin variaciones abruptas en la extensión de la colonización; en contraste, los cambios más extremos o rápidos asociados a la concentración de minerales o la erosión del suelo pueden disminuir marcadamente la formación de micorrizas. La restauración de las poblaciones micorrízicas dependerá de la disponibilidad de fuentes accesibles de propágulos y de la adecuada preparación del suelo para el desarrollo de las plantas y el hongo (Zak y col., 1990.)

Sivila y Hervé (1994) estudiaron el efecto de la rotación y descanso del suelo sobre las micorrizas y otros microorganismos en el altiplano boliviano, evaluando el suelo a la profundidad de 5 a 20 cm y, al establecerse especies de plantas nativas dominantes, se incrementaron de forma natural las micorrizas en el suelo.

Chu y Diekmann (1994) enunciaron que las poblaciones nativas de hongos MA pueden estar afectadas por las alteraciones físicas, químicas y biológicas que se producen en el suelo. Dichos autores observaron que las poblaciones de micorrizas eran mayores a la profundidad de 0 a 10 cm y que el uso de leguminosas como cobertura incrementó de dos a tres veces las poblaciones de dichos hongos.

Vivekanandan y Fixen (1991) encontraron niveles de micorrización en maíz generalmente superiores cuando el cultivo antecesor fue cebada. Thompson y col. (1991) demostraron que el peso seco y el rendimiento en semilla varía en dependencia del cultivo antecesor y está relacionado con la densidad de esporas antes de la siembra. Cuando se usaron leguminosas o girasol como cultivo antecesor, generaron las más altas densidades de esporas residuales y resultó superior el peso seco de semillas de lino.

Algunos estudios han demostrado que la colonización por una especie de hongo micorrízico puede ser diferente en dos especies de planta y estas diferencias pueden ser el resultado de la variación en la estructura de los tejidos de la raíz, produciendo distintas restricciones sobre el hongo (Brundrett y Kendrick, 1990).

La variación estacional en la composición botánica puede conducir a variaciones comparables ó proporcionales en la formación de micorrizas, lo cual es resultado del carácter específico de la intensidad de la infección. En Brasil, Espindola (1994) comprobaron que los abonos verdes son una alternativa interesante para el manejo de las poblaciones nativas de hongos MA en el cultivo del boniato al mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

De las diversas investigaciones realizadas por Johnson y col. (1992), estos generalizaron que:

- Los barbechos y los cultivos sin micorrizas reducen la cantidad de propágulos de hongos MA, lo que resulta en una reducción en la asimilación de nutrientes y en el rendimiento de los cultivos subsecuentes dependientes de la micorrización. Los cultivos que están altamente colonizados por hongos MA generan mayores densidades de propágulos del hongo y un desorden en el desarrollo de un barbecho largo resulta más efectivamente atenuado en los cultivos subsecuentes que en el caso de los cultivos que están menos colonizados
- Ciertos cultivos forman micorrizas, preferencialmente, con ciertas especies de hongos MA; por tanto, las secuencias de cultivo pueden influir en la composición de especies de las comunidades de dichos hongos, fundamento para la hipótesis de que los monocultivos continuos seleccionan como cepas para asociarse a aquellas que son mutualistas inferiores.
- No se debe hacer una generalización simplista acerca de los efectos de los fertilizantes sobre las micorrizas; la fertilidad inicial del suelo, el contenido de MO, el balance de nutrientes dentro del fertilizante, la

identidad del cultivo y las cepas de micorrizas dentro del sistema pueden mediar en tales efectos.

- La ruptura de la red de hifas micorrízicas en el suelo por el laboreo puede perjudicar la absorción de nutrientes y reducir los rendimientos de los cultivos.

Por otra parte, algunos trabajos experimentales sugieren que la toma de potasio en suelos con deficiencias de este elemento se realiza a través de las hifas de los hongos MA, incrementándose la absorción y los contenidos en las plantas micorrizadas (Sieverding y Toro, 1988).

Las bases tales como el magnesio y el calcio tienen un papel importante en la colonización y esporulación por los hongos MA. Anderson y Liberta (1992) encontraron que las plantas tratadas con esas bases tuvieron una alta colonización pero menos esporulación que aquellas sin esas enmiendas. Esos resultados coinciden con trabajos realizados anteriormente que demostraron que el Ca es un buen producto estimulador de la esporulación. El efecto inmediato de la pérdida de la selectividad del ión y el derrame de sustratos pueden conllevar a pérdida de fuentes de carbono para los hongos, así como la exposición de los arbusculos de los mismos a compuestos potencialmente dañinos tales como las peroxidasas.

Dado que el calcio es necesario para el crecimiento de las células y no es movilizado, su concentración en los tejidos de las raíces caen por debajo del nivel crítico y, por tanto, puede disminuir o detener la colonización radical en la capa donde se desarrollan las raíces con ese sustrato. Simpson y Daft (1990) demostraron que no se produjeron nuevas esporas en el cultivo de maíz cuando este alcanzó la madurez fisiológica y la colonización se detuvo. El efecto de una deficiencia de calcio sobre la formación de las nuevas células corticales puede afectar la reproducción del hongo.

Jarstfer y Farner (1998) demostraron que, tanto en boniato como en ajo, la deficiencia de Ca provocó una senescencia temprana de la raíz y la concentración de iones hidrógeno en solución pudo ser un factor significativo en la intervención descrita en ese trabajo, especialmente si los iones tóxicos están presente y su actividad es grandemente dependiente del pH (Habte y Soedarejo, 1995).

Glynder y col. 1992, citados por Jarstfer y Farner (1998), encontraron que las más altas tasas de colonización y producción de biomasa en maíz fueron logradas con la adición de Mg a un suelo ligeramente ácido. Las pérdidas de compartimentación de los tejidos y su senescencia pudieron alterar de inmediato la función de las micorrizas.

### 2.3.3 Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal ( RPCV).

La inoculación con rizobacterias puede provocar estimulación en la germinación de las semillas e incrementos en la producción de masa fresca aérea y radical, contribuyendo a una mayor absorción de nutrientes del suelo por su influencia en el aumento del sistema radical, lo que, a la vez, provoca un incremento posterior en la adquisición de sustancias nutritivas y agua por la planta.

Las interacciones que se establecen entre las plantas y los microorganismos son el resultado de eventos iniciales de reconocimiento que provocan alteraciones en la síntesis e inducción de proteínas, en su mayoría enzimas, las cuales desempeñan un importante papel en la conservación íntegra de cada parte o componente de la planta. En la parte vegetativa de la planta las proteínas son, fundamentalmente, enzimas, mientras que en semillas y granos la fracción proteica mayor corresponde a las proteínas de reserva. También hay que distinguir las proteínas estructurales, que se encuentran fundamentalmente en las membranas biológicas junto a los lípidos (Hernández, 1998).

Diversos estudios han sido realizados en esta temática, definiéndose los factores fundamentales que ejercen su acción sobre el quimiotaxismo y relacionando este último con la migración bacteriana. Las bacterias son atraídas o repelidas en función de un gradiente de sustancias químicas que estimulan o inhiben su crecimiento. El mucílago es el responsable de la quimioatracción o quimioelución (Hernández, 1998).

La fijación de dinitrógeno en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas tiene una gran importancia en la agricultura (Kahindi y col., 1997). Dicho proceso se lleva a cabo con un beneficio máximo para la planta cuando el suelo presenta buena estructura, no existe deficiencia de molibdeno, boro ni de nitrógeno combinado en el suelo, la presencia de cepas de bacterias específicas alcanza un número suficiente y las condiciones para el desarrollo de las plantas son favorables. Esta fijación es realizada por un número limitado de especies procariotas, generalmente bacterias y algas verde-azules, y se manifiesta en diversos procesos tanto simbióticos como no simbióticos. Dentro del grupo de microorganismos procariotas que establecen simbiosis se encuentran bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y entre de los microorganismos de vida libre que establecen fijación no simbiótica del nitrógeno se encuentran bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Clostridium* y otras (Mora, 1998).

Calderón (1996), evaluando el efecto de diferentes dosis de nitrógeno sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, obtuvo que dosis de 35 a 48 kg N.ha<sup>-1</sup> fueron óptimas para el buen establecimiento de la infección bacteriana y la formación de nódulos. Ruíz y Leyva (1997), en condiciones de maceta con un suelo Pardo grisáceo (cv. William 82 y CubaSoy 23), estudiaron el uso de *Rhizobium* y su combinación con diferentes dosis de fertilizantes minerales, encontrando que los rendimientos de masa verde y la nodulación en soya se vieron favorecidos por la inoculación y la combinación de esta con dosis bajas de nitrógeno (30 kg N.ha<sup>-1</sup>).

### 2.3.3.1 Colonización.

Se ha demostrado que las bacterias poseen características que permiten su adaptación a una gran variedad de ambientes, destacándose por metabolizar una amplia gama de sustancias carbonadas exudadas por las raíces de las plantas, cuestión que favorece una fuerte asociación con estas, en las cuales se multiplican con facilidad (Hernández, 1998).

***Burkholderia***. Es una bacteria que coloniza la superficie radical. Se plantea que la quimiotaxis es el primer paso necesario para su establecimiento y colonización radical. En la raíz, esta bacteria forma microcolonias que podrían disminuir producto de la competencia microbiana; esta interacción puede estar influenciada por diferentes factores tales como la especie de planta, la zona radical y el contacto de la célula con la superficie de la raíz (Marschner y col., 1997).

Hernández y col. (1998), en un estudio bajo diferentes condiciones edafoclimáticas, encontraron que *Burkholderia* constituía la población dominante en la rizosfera del maíz, con relación a las poblaciones de *Streptomyces*, *Bacillus* y *Azospirillum*, destacándose *B. cepacia* por la mayor frecuencia de aparición. Asimismo, Hebbar y col. (1994) demostraron que rizobacterias pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Bacillus* son los antagonistas bacterianos más frecuentemente aislados de un suelo cultivado con maíz, representando las poblaciones de *Burkholderia* el 88% de la microbiota total.

Se ha demostrado que *Burkholderia* coloniza eficientemente diversos cultivos de interés agrícola; así, se ha encontrado en la rizosfera de plantas medicinales y de diferentes plantas ornamentales tales como clavel, gladiolo y gerbera (Hernández, 2002).

Con regularidad, aparecen en los aislamientos de la rizosfera del maíz bacterias pertenecientes a este género. Ellas poseen características que les permiten adaptarse a una gran variedad de ambientes diferentes, destacándose por su corto período de latencia, rápida velocidad de crecimiento y capacidad de metabolizar una amplia gama de sustancias carbonadas exudadas por las raíces

de las plantas (Hernández y col, 1998). Hebbar y col. (1994) informaron haber realizado diferentes aislamientos de esta zona, demostrando la abundante presencia de *Burkholderia* sp. Asimismo, Hernández y col. (1995), en estudios realizados con este grupo bacteriano, corroboran que *Burkholderia* constituye el género predominante en la rizosfera del maíz.

Entre los mecanismos de acción que esta especie posee para el biocontrol se destacan la inhibición del crecimiento del patógeno por competición por el  $\text{Fe}^{3+}$  (hipótesis de los sideróforos), por producción de sustancias volátiles o difusibles (antibiosis) y por la inducción de resistencia en la planta (De la Cruz y col., 1992)

**Azospirillum**. Después de su aplicación al suelo, *Azospirillum* puede adaptarse rápidamente a las condiciones siempre cambiantes de la rizosfera de las plantas, incluyendo los frecuentes cambios en la disponibilidad de nutrientes y la interacción con los microorganismos indígenas que también compiten por estos. Estas interacciones pueden ser antagónicas o sinérgicas, del tipo predador-presa, donde la célula de *Azospirillum* puede servir como alimento a la micro y macrofauna siempre deficientes de nutrientes (Bashan y Levanony, 1990). Existen numerosas evidencias de la penetración de *Azospirillum* en las raíces de las plantas. Cuando la bacteria entra en contacto con la raíz, existe una atracción quimioestática activa o pasiva, ocurriendo muchos pasos antes de que la asociación sea completamente estable. Con respecto a esto, García 1993, citado por Pazos y Hernández (1999), plantea que, al ser inoculada, la bacteria migra, se multiplica y forma agregados de colonización, las células bacterianas son conectadas entre sí y con la superficie radical mediante un material fibrilar. Según estos autores, existen dos tipos de colonización: una población bacteriana externa localizada en la superficie de la raíz, en la capa del mucílago, y una población interna localizada en la corteza de la raíz. Se ha observado que las bacterias también colonizan las raíces muertas. Bashan y col. (1996) observaron que, cuando se inocula el suelo, ocurre un período adaptativo no motil de 21 a 36 horas antes de la migración. Durante este período “log” los sensores de la bacteria son activados y la señal es transmitida hacia el sistema mótil (flagelo).

Los diferentes pasos de ataque se distinguen en la formación de una asociación entre *Azospirillum* y la planta hospedera (Van, 1998). La fase I de adhesión es rápida (demora como máximo 2 h de incubación), débil y reversible (Bashan y Holguín, 1997). La fase de anclaje es larga (comienza sólo después de 8 h de incubación y termina, como máximo, después de 16 h), fuerte e irreversible. En este estado las fibrillas de celulosa son producidas con el objetivo de que el anclaje a la bacteria sea más estrecho. Cuando la asociación es establecida, la

bacteria produce sustancias promotoras del crecimiento vegetal y la planta es estimulada a producir hormonas exógenas.

Vande Broek y Vanderleyden (1995) concuerdan con estas fases de colonización y con la participación de diferentes componentes de la bacteria, como es el caso del flagelo polar. Además, Bashan y Holguín (1997) afirman que las células de *Azospirillum* exhiben un extensivo agregado de colonización que les provee de una ventaja ecológica con respecto a otras bacterias.

Según Freitas y Germida (1990), las formas de colonización son muy variadas. Estos autores, utilizando el cultivo de tejidos, estudiaron las interacciones de diferentes rizobacterias en el trigo y observaron, mediante una micrografía con un explorador electrónico, a microcolonias de *Azospirillum* distribuidas a lo largo de los pelos radicales y al nivel de las células epidérmicas.

Vande Broek y Vanderleyden (1995) informaron que los sitios de colonización preferencial son las zonas de las raíces laterales y de los pelos radicales y Del Gallo y Frenrik (1994) plantearon que algunas cepas de *Azospirillum* pueden colonizar los espacios intercelulares de las cortezas radicales externas. Las especies bacterianas comprendidas en este género crecen a diferentes pH, que varían entre 5,5 y 8,5 (Eory y col., 1995). Las temperaturas requeridas para su óptimo crecimiento (32 - 36 °C) pueden explicar la mayor incidencia de estos organismos en las regiones tropicales y subtropicales, aunque su presencia ha sido detectada en sitios de zonas templadas y otras regiones (Nosto y col., 1994).

Un gran número de trabajos describen los efectos que produce la bacterización con *Azospirillum*. Estos han sido medidos a través del aumento de la masa seca total, el contenido de nitrógeno en las hojas, granos y brotes, la floración y aparición temprana de las espigas, el número de espigas y granos, la masa y tamaño del grano, el índice de área foliar y la tasa de germinación, además de otros indicadores relacionados con el desarrollo del sistema radical (Fernández, 1995; Hernández, Y. y col., 1996; Stancheva, 1998; Pandey y col., 1998; Woodard y Bly, 2000). El efecto sobre el rendimiento total en experimentos de campo oscila entre 20 – 30 % (Gaikwad y Bhate, 1996 )

La interacción *Azospirillum*-planta depende de la sobrevivencia y persistencia de la bacteria en el suelo y de la efectiva colonización de las raíces. Una de las propiedades que contribuye al inicio y mantenimiento de la relación es la quimiotaxis, que influye indirectamente en las interrelaciones entre los microorganismos colonizadores a través de la acción selectiva que ejerce sobre especies o grupos particulares (Hernández, 1998).

Existen numerosas investigaciones que corroboran la interacción beneficiosa de *Azospirillum* con diferentes cultivos. Por ejemplo, Purcino y col (1996) estudiaron la relación de las bacterias de este género con el maíz. Además, se ha visto que *Azospirillum* coloniza cultivos como caña de azúcar, trigo, cebada, alfalfa (Khammas y col., 1994; Creus y col., 1996; Velazco, 1997) con gran éxito. Por su parte, Terry y col. (1998) establecieron que el empleo de *Azospirillum* sp, en el cultivo del tomate permitió acortar el periodo de semillero. Igualmente, Lara (1999) encontró que la combinación *Azospirillum brasilense* Sp7-hongo micorrízico (*Glomus clarum*) resultó muy eficiente para el cultivo del tomate en fase de producción de plántulas y de campo, con un 20% de incremento en los rendimientos agrícolas y una disminución sustancial del aporte de fertilizantes nitrogenados, fosfóricos y potásicos.

El arroz es uno de los cultivos con el que más se asocian las rizobacterias del género *Azospirillum*, observándose su presencia en regiones edafoclimáticas tan diferentes como Egipto, Brasil, Francia y Cuba, entre otras (Velazco, 1997).

Recientemente se ha logrado realizar aislamientos de *Azospirillum* sp en raíces de maíz (Hernández y col., 1998), caña de azúcar (Velazco, 1997) y arroz (Khammas y col, 1994; Pazos y Hernández, 1999). También ha sido demostrado la efectiva colonización de este género en cultivos como el trigo (Creus y col. , 1996).

Bowen (1991) señaló que, en la medida que la disponibilidad de agua en la rizosfera sea menor, el movimiento microbiano para colonizar nuevas raíces será extremadamente limitado y la motilidad por flagelación nula. El contenido de agua en los suelos también influye en la velocidad de difusión de sustratos, en la misma medida que los exudados de las plantas influyen en la colonización bacteriana de la rizosfera (Fernández y Novo, 1988).

Una vez colonizada la raíz, el movimiento de las bacterias en el sistema radical y entre plantas vecinas se convierte en un mecanismo de dispersión que incrementa la supervivencia de las células de *Azospirillum*. Estas son totalmente dependientes de la presencia de las raíces para sobrevivir, ya que en ausencia de plantas la bacteria es fuertemente adsorbida en las fracciones arcillosa y orgánica del suelo mediante una interacción pasiva carga-carga, donde el movimiento es extremadamente restringido, aún en presencia del agua de percolación (Castellanos y col., 1998). La interacción que se establece entre las células bacterianas y las partículas del suelo está influenciada por la disponibilidad de quimioatrayentes y las condiciones físicas y químicas del suelo y es uno de los factores que afectan la migración de la bacteria

El movimiento de *Azospirillum* desde el sitio de inoculación a las raíces es esencial para el logro de la colonización. Este movimiento puede abarcar desde unos pocos micrones hasta varios centímetros y va a depender de la producción de sustancias quimioatrayentes por la pared de las raíces y del ambiente de competición con otros microorganismos que también necesitan nutrientes. Por tal razón, la movilidad en la especie de *Azospirillum* es considerada un rasgo muy importante.

Bashan (1999) demostró que un incremento del contenido de arcillas o de materia orgánica en más del 5%, incrementa la adsorción a niveles similares de cualquier otra bacteria del suelo. La baja humedad o un incremento en el pH va en detrimento de la adsorción (la disminución del pH incrementa la densidad de cargas positivas sobre los ángulos o filas de las partículas del suelo, aumentando la adsorción); esto puede ocurrir en suelos anegados y las plantas con sus exudados ayudan a disminuir el pH.

A partir de lo anterior se puede formular la hipótesis de que la falla parcial al inocular *Azospirillum* para colonizar algunas raíces puede ser atribuida a un incremento en la capacidad de adsorción del suelo, lo cual reduce el número de bacterias disponibles para la colonización de la raíz.

#### **2.3.4 Las coinoculaciones HMA-RPCV.**

En la rizosfera, los diferentes grupos de organismos del suelo no viven independientemente unos de otros, sino que forman un sistema interconectado, más o menos en equilibrio, según las condiciones del suelo. Muchas interacciones tienen lugar entre los hongos micorrízicos y los demás microorganismos en la rizosfera y las respuestas de las plantas a las micorrización involucra no solamente al hongo, sino a todos los micro y macroorganismos presentes (Ingham y Molina, 1991).

Entre la multitud de microorganismos que conforman el agroecosistema, los hongos MA resaltan porque tienen la capacidad de formar puentes entre las plantas y el suelo; estos hongos colonizan y penetran en las raíces de las plantas, mientras sus hifas están en íntimo contacto con la microbiota que habita en los agregados del suelo y contribuye a la formación de su estructura.

A través del flujo de nutrientes entre el suelo y las plantas, el hongo influye tanto en el crecimiento de las plantas y su salud como en el desarrollo de las comunidades de microorganismo del suelo. Esas complejas relaciones pueden ser estimulantes, antagónicas o ambas en dependencia de las circunstancias. (Bethlenfalvay y Schuepp, 1994).

Los hongos micorrízicos viven en estrecha interrelación con un amplio grupo de microorganismos que conviven en la rizosfera. Linderman (1988) plantea que es más apropiado utilizar el término “micorrizosfera” por la particularidad que encierra esta simbiosis en el suelo y lo que ella significa en la acción directa e indirecta de la micorriza con los organismos y microorganismos del suelo.

Garbaye y Duponnois (1991) definieron la zona hifosférica o micorrizosférica como la región en las raíces de las plantas micorrizadas, en íntimo contacto entre microorganismos presentes y el micelio extramátrico del hongo, resultando esta de vital importancia porque el hongo micorrízico utiliza los exudados radicales y provoca modificaciones en las funciones de las raíces y de las comunidades microbianas que son diferentes a las existentes en la rizosfera y en el suelo. Una amplia variedad de organismos vive en la zona micorrizosférica aprovechando la gran cantidad de compuestos orgánicos que se liberan por las plantas, debido a que estos se pueden separar en varios grupos tróficos.

Las hifas de los hongos MA pueden extender la rizosfera (Camel y col., 1991) a un volumen mayor de suelo y así constituyen una importante fuente de carbono para el resto de los organismos del suelo; aunque este carbono no se cuantifica, se aprecian cambios sustanciales en las poblaciones bacterianas más allá de las raíces de las plantas, contribuyendo a aumentar la masa microbiana del suelo.

Los fragmentos de hifas y raíces, además de esporas muertas y esporocarpios, pueden actuar como núcleos en la formación de agregados y suplir los sustratos necesarios a la comunidad microbiana. En experimentos realizados por Secilia y Bagyoraj (1987), se determinaron, cuantitativa y cualitativamente, las poblaciones de bacterias y actinomicetos en *Panicum máximum* cultivado en macetas e inoculado con hongos MA. La población total de bacterias y fijadores de nitrógeno en la rizosfera de la gramínea fue superior en las variantes que estaban colonizadas por las cepas *Glomus fasciculatum*, *Gigaspora margarita* y *Sclerocystis dussi*, en comparación con las variantes donde no se inoculó.

La colonización múltiple por diferentes especie de hongos y bacterias está asociada con un beneficio más consistente, en un rango mayor de condiciones ambientales, que cuando se usan microsimbiontes simples. Esta diversidad de población capaz de responder a diversas condiciones de estrés es considerada como la responsable de la alta productividad de algunos suelos.(Ellis y col., 1992).

La aplicación de cepas de *Pseudomonas* junto con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* incrementa la nodulación y productividad de las leguminosas

(Grimes y Mount, 1987). Al inocularse conjuntamente *Azospirillum* y *Rhizobium* se obtienen incrementos significativos en el número de nódulos, con respecto a los inóculos puros, lo que se debe a la producción y liberación de hormonas por *Azospirillum* (Schmidt y col., 1988). La inoculación dual de cepas estimuladoras del crecimiento vegetal con varias especies de *Rhizobium* causa un incremento en el número de nódulos de la raíz con relación a las plantas inoculadas con *Rhizobium* solo (Plazinski y Rolfe, 1991).

La asociación de hongos MA y *Rhizobium* en plantas leguminosas hace posible que estas puedan crecer bajo limitados regímenes de N y P en los suelos no fertilizados, pues los tres simbioses garantizan las fuentes de C, N, P para la simbiosis y también el mejor almacén para los productos obtenidos resultado de su asociación (Barea y col., 1992). En ese sentido, Azcon-Aguilar y Barea (1991), al evaluar el efecto de coinoculación de *Rhizobium* con *Glomus fasciculatum* y *Glomus mosseae*, encontraron incrementos en la concentración de N en el suelo y en la planta, sugiriendo que esos incrementos pueden estar determinados por incrementos en la fijación biológica del N<sub>2</sub>.

La mayoría de las leguminosas responden favorablemente a la colonización con hongos micorrízicos por cuanto incrementan principalmente el suministro de fósforo para el proceso de fijación de nitrógeno por el sistema *Rhizobium*-leguminosa (Barea y col., 1992). Bajo condiciones de campo, las plantas de soya generalmente presentan dos tipos de microorganismos simbióticos sobre sus raíces. Estos simbioses, *Bradyrhizobium* sp. y los hongos MA, están capacitados para aumentar el crecimiento de las plantas por suplementación del nitrógeno y otros nutrientes poco móviles del suelo, como el fosfato, a la planta hospedera (Zhang y col., 1995).

Según Damba (1994) y Hernández y Hernández (1996), la inoculación de semillas de soya variedad G7R-315 con la mezcla de la cepa de *Rhizobium japonicum* ICA 8001 y la cepa de HMA *Glomus clarum* sin aplicación de fertilizante, evidenció una influencia positiva sobre el desarrollo vegetativo y provocó un incremento considerable del rendimiento del cultivo.

Pijeira y col. (1996) concluyeron que la aplicación del Biofertbol (inoculante micorrizógeno) combinado con inoculantes nitrofixadores y AzoFert (*Bradyrhizobium japonicum*) mejora la nodulación de las plantas y estimula el crecimiento vegetativo aumentando la eficiencia del *Bradyrhizobium japonicum*. Amaya y col. (1996), evaluando el uso de cepas nativas e inoculadas con *Rhizobium*, hongo MA y tres niveles de fósforo (0, 60 y 120 kg.ha<sup>-1</sup>) en frijol, encontraron que la interacción entre los factores determinó que la infección de

ambos endófitos (*Rhizobium* y hongo micorrízico) fuera significativa para el rendimiento de la planta. La interacción *Rhizobium*–HMA-frijol tuvo un efecto significativo en el número de esporas micorrízicas presentes en el suelo, demostrándose que los endófitos nativos están mejor adaptados a los suelos que habitan.

Cornejo y col. (1996), validando el efecto de la aplicación de inoculantes de doble acción a base de *Rhizobium* y de hongos micorrízicos en campos de agricultores donde compararon los rendimientos de los tratamientos frente a un testigo con tecnología convencional en el distrito de Chiguata (Perú), obtuvieron con la inoculación incrementos en el rendimiento de alfalfa de un 44 % y en habas de un 100 %, correlacionados con la biomasa de las leguminosas.

En la biofertilización del ajo (*Allium sativum* L), Gómez y Muñoz (1998) evaluaron el efecto de varios microorganismos (*Pseudomonas cepacia*, *Azospirillum brasilense* y *Glomus clarum*) en aplicaciones individuales y combinadas, utilizando la tecnología del recubrimiento de la semilla, comparándolas con un control de fertilización mineral, obteniendo los mejores resultados con la aplicación de *Glomus clarum*, con incrementos respecto al control de 14 - 48 %; además, con el empleo de las rizobacterias se sustituyó el 25 % del nitrógeno. Por su parte, la inoculación mixta *Azospirillum*–HMA provocó incrementos significativos en el crecimiento y contenido de fósforo de las plantas (Gori y Favilla, 1995; Toro y col., 1996; Hernández, M.I., 2000), lo que permitió sustituir completamente la aplicación de fertilizantes fosfóricos y nitrogenados y favorecer la colonización de plantas por los hongos micorrízicos

Otro efecto del sinergismo ha sido observado cuando, al inocular *Azospirillum*, la descomposición de la paja por bacterias celulolíticas se ve favorecida. Se ha demostrado que la mezcla de estos cultivos bacterianos, ya sea en cultivos líquidos o en el suelo, resulta ser más eficiente en la descomposición de la paja que las bacterias celulolíticas por sí solas. Esta interacción también favorece la fijación de N<sub>2</sub> por *Azospirillum*. Teniendo en cuenta que la población de *Azospirillum* se ha estimado que representa el 1 - 10 % de la población rizosférica total (Bashan y col., 1996), su presencia puede verse afectada por muchas otras especies de bacterias y esto debe ser considerado a la hora de que *Azospirillum* sea aplicado al suelo.

### **2.3.5 La biofertilización y la fertilidad del suelo. Los sistemas integrados.**

Los sistemas integrados de nutrición se diferencian del manejo convencional en que tienen mayor alcance, considerando los nutrientes de diferentes fuentes, fundamentalmente de materiales orgánicos (incluyendo

microorganismos), los aportados por los cultivos anteriores, la dinámica, transformación, interacciones y la disponibilidad de nutrientes en el espacio (zona de crecimiento de raíces) y el tiempo (etapa de desarrollo), en relación con las demandas de los cultivos, por lo que integra objetivos productivos, ecológicos y ambientales que conllevan a la óptima nutrición de los cultivos, al óptimo funcionamiento de la biosfera y a minimizar las pérdidas de nutrientes y otros efectos adversos sobre el ambiente.

Generalmente se relaciona la efectividad de las hongos micorrízicos con el nivel de fósforo en el suelo, no esperándose efectos positivos a niveles altos de P asimilable. Sin embargo, Siqueira y Franco (1988) encontraron respuestas a niveles supuestamente altos de P, alcanzando porcentajes de colonización aceptables que se incrementaron con el tiempo. Aunque generalmente se acepta que los niveles de colonización por HMA disminuyen con el incremento del fósforo asimilable, Miller y col. (1995) observaron que la disminución no es tan grande. Un grado razonable de colonización fue encontrado a niveles de P asimilables muy por encima de lo requerido para la obtención del crecimiento máximo. Se encontró también que las reducciones en la colonización son mayores en las raíces que crecen en las zonas fertilizadas que en las raíces que están fuera de dicha zona. Por eso, aunque las bandas de fertilizantes pueden reducir marcadamente la colonización en la zona fertilizada, el resto de las raíces del sistema pueden ser bien colonizadas e incrementar la habilidad para adquirir P.

La fertilidad inicial del suelo puede ser importante en el efecto inmediato de los fertilizantes sobre las micorrizas; en tal sentido, muchos investigadores sugieren que las poblaciones de hongos MA son adaptadas a un nivel dado de fertilidad. Dehne (1988) demostró que la fertilización en suelos naturalmente estériles reduce la micorrización mientras la fertilización de suelos naturalmente fértiles tiene poco o ningún efecto. Los efectos del desarrollo micorrízico a altos niveles de nutrientes deben ser estudiados y es importante señalar la influencia de los hongos MA cuando ellos no confieren un beneficio nutricional (Gavito y Miller, 1998).

### **2.3.6 Los microorganismos y las propiedades físicas de los suelos.**

Muchas prácticas agrícolas ayudan a la protección del suelo y a elevar la calidad del agua, mientras mantienen o incrementan su productividad. Estas prácticas tienen un potencial significativo para disminuir los daños en áreas frágiles y en el hábitat natural; así, indirectamente, se mejora la biodiversidad, mitigando muchos de los efectos que provocan los productos agroquímicos y la excesiva erosión en la agricultura moderna (Jitendra y col., 1996). La respuesta

del suelo a la actividad microbiológica puede estar relacionada en mayor o menor medida con las respuestas de las plantas. La aplicación de hongos MA, solos o combinados con otros microorganismos, puede resultar un beneficio neto en cuanto al balance de la producción agrícola y la conservación de los suelos en diferentes agroecosistemas. Por tanto, la inclusión de la respuesta del suelo en la evaluación de la eficiencia de los HMA es una necesidad. ( Miller y Jastrow, 1992).

La formación y estabilización de los agregados del suelo protege la materia orgánica, disminuye las pérdidas de nutrientes por lavado e incrementa las posibilidades de las plantas para suplir necesidades futuras de nutrientes después de la mineralización. Los procesos de empaquetamiento de las partículas de suelo dentro de los agregados han sido identificados como el recurso a través del cual la materia orgánica aumenta en el suelo. Por tal razón, los agregados no deben ser vistos sólo como un recurso a través del cual los suelos resisten la fuerzas erosiva del viento y el agua, sino, también, como un factor contribuidor a la acumulación de materia orgánica en ellos.

Aunque las primeras investigaciones realizadas sobre la contribución de la biota a la estructura del suelo se realizaron en 1930, sólo recientemente los hongos micorrízicos fueron reconocidos como entes activos de los procesos de agregación del suelo. Su grado de contribución a la agregación del suelo en la capa arable está relacionada con el cultivo, las prácticas de laboreo y el tipo de suelo ( Miller y Jastrow, 1992).

La contribución de las hifas de hongos MA a la formación de agregados del suelo es debida primeramente al enrejado físico que ocurre dentro de la rizosfera. Las hifas externas enlazan a los microagregados para crear unidades de agregados mayores. También esto puede ocurrir a niveles superiores de organización donde pequeños microagregados son empaquetados para formar macroagregados ( Miller y Jastrow, 1992).

La contribución de las micorrizas a la formación de agregados del suelo puede agruparse en tres procesos estrechamente relacionados: 1) crecimiento de las hifas externas de los HMA dentro de la matriz del suelo, lo que crea el esqueleto de la estructura que mantiene unidas las partículas del suelo; 2) creación por las hifas y las raíces de las condiciones que propician la formación de microagregados; 3) enlace de microagregados y pequeños macroagregados por hifas externas para crear las estructuras de los macroagregados.

Esos tres procesos ocurren simultáneamente a través de la dinámica natural de la agregación del suelo. En sistemas de suelos donde las arcillas y la materia orgánica están ausentes ó presentes en muy pocas cantidades, los

agregados no se forman ó, en última instancia, solo pueden desarrollarse lentamente más allá del primer proceso.

La formación de agregados es un importante factor en la estabilización del suelo y la creación de una reserva de nutrientes; por tanto, los hongos micorrízicos son importantes en la conexión de la restauración de la vegetación al restablecer los procesos de formación de estructuras del suelo y a la reactivación de los ciclos de nutrientes (Miller y Jastrow, 1992). Los hongos MA son agentes efectivos en la agregación de los suelos, por lo que el manejo de ellos puede ser considerado como una técnica para mejorar la estructura en diversas condiciones (Shreiner y Jastrow, 1995). La habilidad de los hongos MA de absorber agua de los pequeños poros de la matriz del suelo contribuye a la estabilización de los agregados, uniendo partículas mediante su envoltura en la red de micelios y mecanismos aglutinantes, lo que influye marcadamente en la productividad de los suelos.

### **2.3.6.1 La glomalina y sus funciones**

Wright (2000) descubrió la sustancia 'glomalina', una glicoproteína exudada por los micelios de los hongos micorrízicos, con la utilización imágenes producidas por la resonancia magnética nuclear, mostrando que dicha sustancia tiene una estructura diferente a cualquier otro componente de la materia orgánica. Los hongos del género *Glomales*, que viven en las raíces de la mayoría de plantas, usan el carbono suministrado por las plantas para producir la glomalina. Durante el crecimiento de las raíces, la glomalina es desechada al suelo donde funciona como una "super-goma", ayudando a la arena y las partículas de arcilla a pegarse junto con la materia orgánica que le da vida al suelo. Según este mismo autor, la glomalina es la sustancia que le provee al suelo su buena estructura, señalando, además, que la misma no es solamente el pegamento que junta el humus a los compuestos del suelo, sino que también la glomalina almacena 27 % de la cantidad total de C del suelo, comparado con 8 % aportado por el ácido húmico. También provee al suelo con N y ayuda a crear la estructura necesaria para retener el agua, garantizar una aeración apropiada, permitir el movimiento de las raíces de la planta y resistir la erosión.

Rillig y Wright (2000) encontraron que el efecto directo de la glomalina fue mucho más fuerte que el efecto directo de las hifas de los propios hongos, sugiriendo que esa proteína está involucrada en un mecanismo muy importante en la estabilización de los agregados, aunque la asociación del hongo con plantas específicas determina la cantidad de agregados estables en el suelo. Wright y col. (2001) señalan que la agregación es un proceso complejo que incluye sustancias cementantes producidas por hongos, plantas y bacterias; las bacterias producen

polisacáridos que evitan la desecación de las partículas y con ello amortiguan los ciclos de seca y humedad que disminuyen la agregación del suelo.

Franzluebber y col. (1999) encontraron que el impacto de la glomalina sobre la conservación de los suelos fue similar a otras estrategias de conservación, como el sistema de no laboreo y el uso forestal, con similar efectos a cultivos de pasto por periodos de 19 años. Almendra (2000), en varios cultivos y sistemas naturales, encontró menor contenido de glomalina en los suelos donde los cultivos alcanzaron baja colonización, encontrando correlación directa entre la estabilidad de los agregados y el contenido de glomalina. Observó además, por técnicas inmunofluorescentes, la glomalina en las superficies de los agregados, con mayores contenidos en los sistemas forestales. Señaló, además, que tanto en zonas frías como en los trópicos, en los suelos existe similar relación entre la estabilidad de los agregados y la glomalina. Rillig y Wrigth (2000) encontraron que el tiempo de permanencia de la glomalina en el suelo osciló entre varios años y décadas, constituyendo una forma de secuestro del carbono, que contribuye, al mismo tiempo, al aumento de la materia orgánica del suelo, considerando que esa glicoproteína puede ser un importante elemento a considerar en los estudios biogeoquímicos.

El factor que más incide sobre los macroagregados presentes en el suelo es el estado de desarrollo de los microagregados. Si la estructura de los microagregados del suelo está pobremente desarrollada, el tamaño de los macroagregados puede ser limitada al enrejado físico de las partículas primarias del suelo y la cementación temporal por agentes orgánicos de ligazón relativamente lábil; además, sin un número significativo de microagregados, el desarrollo de los poros inter-macroagregados es mínimo, lo cuál, comúnmente, restringe la actividad de los organismos del suelo dentro de esos macroagregados. Siempre que estén presentes en el suelo agentes adicionales para la creación de microagregados, como las arcillas, los cationes polivalentes y los residuos orgánicos, los hongos micorrízicos pueden contribuir al desarrollo de los microagregados y mejorar la calidad de los macroagregados.

Al mismo tiempo que los macroagregados están siendo creados, ellos también están siendo degradados debido a varios factores, incluyendo la presión física por el crecimiento de las raíces, la descomposición de los agentes cementantes o los cambios en las prácticas de manejo que reducen el crecimiento de las hifas y las raíces. En contraste con esto, los microagregados, una vez estabilizados, son sólo lentamente degradados debido a la gran protección física y resistencia química de sus componentes orgánicos (Shreiner y Jastrow, 1995).

Cuando la estructura de los microagregados es relativamente estable, como en los Mollisoles degradados por cultivo en hileras, están creadas las bases necesarias para la creación de macroagregados muy estables y la contribución de los hongos MA a la restauración de la estructura de los macroagregados será extremadamente importante. Las hifas de los hongos micorrízicos alteran las propiedades del suelo a su alrededor, produciendo un efecto similar al efecto rizosférico producido por las raíces (Li y col., 1991) y la habilidad de penetrar a pequeños poros y producir una extensa red de hifas en la matriz de suelo, son importantes factores en la formación y estabilización de los agregados.

### III. Materiales y Métodos

#### 3.1 Ubicación de los experimentos y condiciones edafoclimáticas.

Para el cumplimiento de los objetivos de trabajo, se llevaron a cabo 4 experimentos de campo en áreas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícola (INCA), situadas a 138 m sobre el nivel del mar, en San José de las Lajas, Provincia La Habana, a 23° 00' de latitud N y 32° 12' de longitud O.

Los experimentos se realizaron durante los años 1998-2001, sobre un suelo Ferralítico Rojo compactado, según el mapa 1:25 000 de la Dirección Nacional de Suelos, que se corresponde con un Ferralítico Rojo compactado eutrítico, según Hernández y col. (1999), cuyas características fundamentales aparecen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características fundamentales del suelo.**

Fertilidad y propiedades físicas										
Prof. (cm)	pH (H <sub>2</sub> O)	M.O (%)	P (ppm)	K <sup>+</sup> (cmol. kg <sup>-1</sup> )	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Densidad (g.cm <sup>-3</sup> )		Kd	Ie
							Da	Dr		
0-20	6,3	2,5	298	0,50	10,2	2,30	1,03	2,78	1,99	0,57
20-40	6,2	2,0	259	0,44	8,8	2,08	1,10	2,80	2,04	0,55
Granulometría (%). Promedio de diferentes puntos										
Prof. (cm)	Arcilla (< 2µm)	Limo (2 - 20 µm)	Limo grueso (20 - 50 µm)	Arena (50 - 200 µm)	Arena gruesa (200 - 2 000 µm)					
0-20	68,9	7,0	7,5	5,5	11,1					
20-40	81,4	3,5	6,5	2,5	6,1					
40-60	85,9	4,0	4,5	3,0	2,6					
60-80	83,0	4,0	5,0	3,0	5,0					
Poblaciones microbianas nativas										
Microorganismo					Población					
Microbiota total					8,9 x 10 <sup>7</sup> (ufc. g <sup>-1</sup> suelo rizosférico)					
<i>Burkholderia cepacia</i>					3,8 x 10 <sup>3</sup> ( " " )					
<i>Azospirillum brasilense</i>					2,4 x 10 <sup>4</sup> ( ufc. g <sup>-1</sup> suelo rizosférico)					
Hongos micorrízicos arbusculares					20 - 40 (esporas. 100 g <sup>-1</sup> suelo)					

Da = Densidad aparente; Dr = Densidad real; Kd = Coeficiente de dispersión; Ie = Índice de estabilidad.

Las condiciones climáticas durante el periodo experimental aparecen en la Figura 1 donde se refleja el comportamiento de las principales variables, así como sus promedios históricos correspondientes a los últimos 30 años. La región se

caracteriza por poseer una temperatura promedio anual de 23,7 °C y dos estaciones bien definidas: “seca” (noviembre - abril) y “lluviosa” (mayo - octubre).

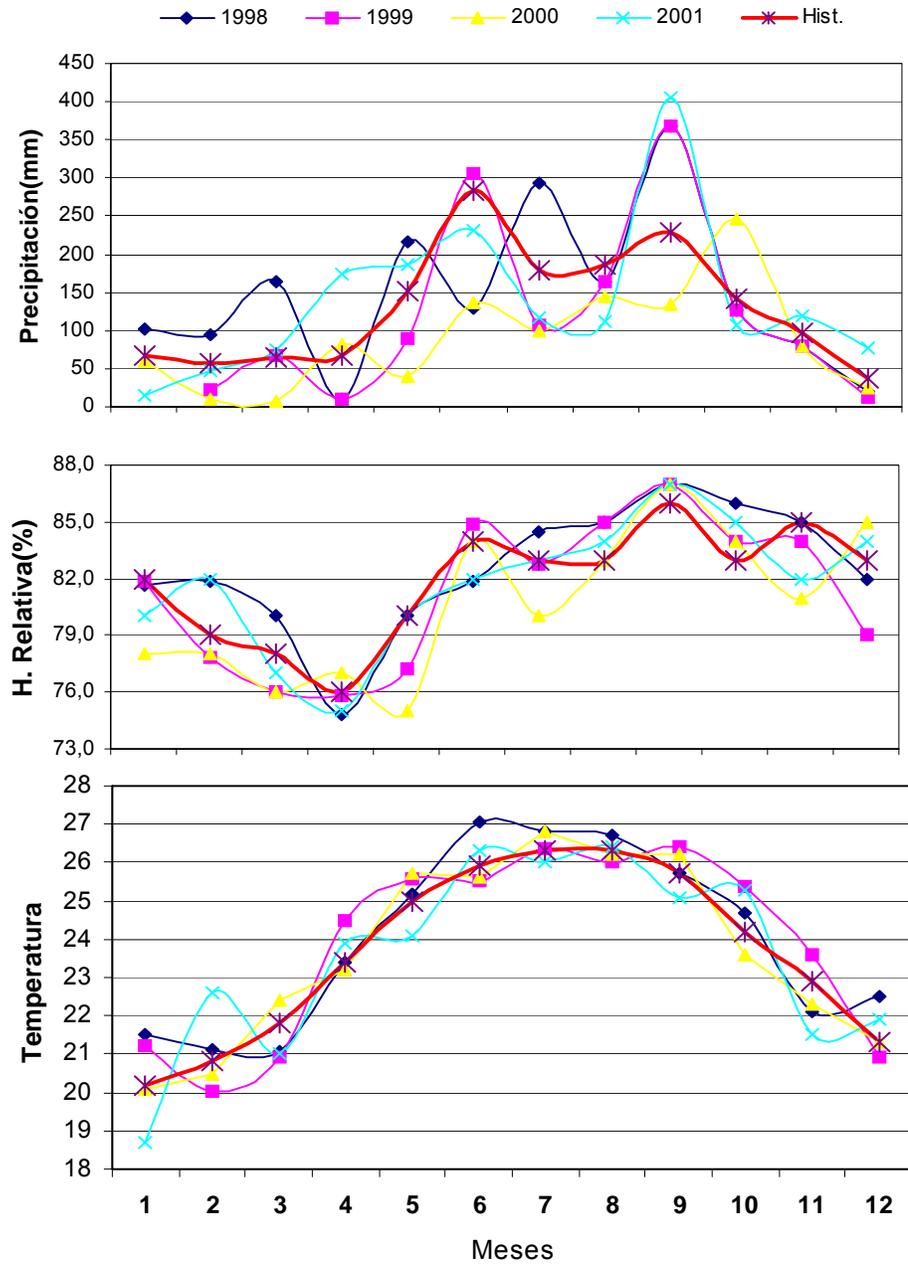


Figura 1. Comportamiento de algunas variables climáticas durante el periodo de estudio y medias para la zona en los últimos 30 años.

### 3.2 Descripción de los experimentos.

En los experimentos se utilizaron como base de estudio 4 secuencias de cultivos, por ser uno de los métodos más eficaces para conservar la productividad de los suelos. Por estas razones, las secuencias incluyeron cultivos de especies leguminosas, que alternan con gramíneas y otros tipos de plantas que, a través de la incorporación de sus residuos y la intensa actividad de su sistema radical contribuyen a la restauración de las condiciones químicas, físicas y biológicas de los suelos. Cada experimento se repitió durante 2 años.

Los tratamientos en cada experimento se conformaron a partir del uso de 4 frecuencias de aplicación de *Glomus clarum*, que fue la especie de HMA predominante en esas condiciones y con mejor eficiencia en suelos de fertilidad media. (Fernandez 1999), coinoculando cada cultivo, además, con una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, según se muestra en la Tabla 2. Las parcelas experimentales fueron de 100 m<sup>2</sup> (10 x 10 m), con un área de cálculo de 48 m<sup>2</sup> y se utilizó un diseño experimental de Bloques al azar con 4 replicas.

**Tabla 2. Esquema de los tratamientos utilizados en los diferentes experimentos.**

Frecuencia de inoculación con HMA	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3
F0	No inoculado	No inoculado	No inoculado
F1	Inoculado con HMA y Rizobacterias	Inoculado con Rizobacterias	Inoculado con Rizobacterias
F2	Inoculado con HMA y Rizobacterias	Inoculado con HMA y Rizobacterias	Inoculado con Rizobacterias
F3	Inoculado con HMA y Rizobacterias	Inoculado con HMA y Rizobacterias	Inoculado con HMA y Rizobacterias

Los datos relacionados con los cultivos, variedades, fecha de siembra, cepas de HMA y rizobacterias y distancias de siembra que se emplearon en los experimentos se muestran en las Tablas 3, 4, 5 y 6.

Para la inclusión de los cultivos en las secuencias, se tuvo en cuenta una alternancia de tipos de plantas, con un adecuado balance general de los nutrientes para evitar esquilmar el suelo y en todas las secuencias se incluyó una leguminosa para garantizar la incorporación de nitrógeno al suelo. Los sistemas de raíces de las plantas utilizadas exploran diferentes volúmenes de suelo; así, en el

experimento 1, la soya, con sus raíces pivotantes, antecede a las raíces fasciculadas del maíz, que a su vez antecede al boniato, que presenta un sistema fasciculado pero menos profundo. Sin embargo, en el experimento 2, los dos primeros cultivos tienen raíces pivotantes, pero el girasol profundiza más que la soya, que es seguida de un cultivo con sistema fasciculado, lo que garantiza que los primeros reciclen elementos nutritivos de las capas más profundas del suelo y aumenten la disponibilidad de nutrientes para posteriores cultivos con una capacidad exploración del suelo más superficial, de acuerdo con Da Costa (1991), quien señaló que las leguminosas actúan como subsoladores biológicos y poseen facilidades para extraer elementos nutritivos pocos solubles, en especial el fósforo.

**Tabla 3. Descripción del experimento 1.**

Cultivos (Variedad)	Frecuencia de inoculación de HMA	Rizobacterias aplicadas	Fecha y marco de siembra (m)
Soya (Incasoy 27)	F0 No inoculado	No inoculado	Mayo 0,70 x 0,05
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (ICA 8001)	
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (ICA 8001)	
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (ICA 8001)	
Maíz (VST-6)	F0 No inoculado	No inoculado	Septiembre 0,90 x 0,20
	F1 No inoculado	<i>Burkholderia cepacia</i> (057)	
	F2 <i>Glomus clarum</i>	<i>Burkholderia. cepacia</i> (057)	
	F2 <i>Glomus clarum</i>	<i>Burkholderia. cepacia</i> (057)	
Boniato (Cemsa 78-354)	F0 No inoculado	No inoculado	Enero 0,90 x 0,30
	F1 No inoculado	<i>Burkholderia cepacia</i> (057)	
	F2 No inoculado	<i>Burkholderia. cepacia</i> (057)	
	F3 <i>Glomus clarum</i>	<i>Burkholderia. cepacia</i> (057)	

**Tabla 4. Descripción del experimento 2**

Cultivos (Variedad)	Frecuencia de inoculación de HMA	Rizobacterias aplicadas	Fecha y marco de siembra (m)
Soya (Incasoy 27)	F0 No inoculado	No inoculado	Mayo 0,70 x 0,05
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (ICA 8001)	
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (ICA 8001)	
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (ICA 8001)	
Girasol (Caburet-15)	F0 No inoculado	No inoculado	Septiembre 0,70 x 0,25
	F1 No inoculado	<i>Burkholderia cepacia</i> (057)	
	F2 <i>Glomus clarum</i>	<i>Burkholderia. cepacia</i> (057)	

Cultivos (Variedad)	Frecuencia de inoculación de HMA	Rizobacterias aplicadas	Fecha y marco de siembra (m)
	F2 <i>Glomus clarum</i>	<i>Burkholderia. cepacia</i> (057)	
Sorgo (ICIAP-Dorado)	F0 No inoculado	No inoculado	Enero 0,70 x 0,05
	F1 No inoculado	<i>Burkholderia cepacia</i> (057)	
	F2 No inoculado	<i>Burkholderia. cepacia</i> (057)	
	F3 <i>Glomus clarum</i>	<i>Burkholderia. cepacia</i> (057)	

En el experimento 3 se utilizaron, de forma continua, dos cultivos con alta demanda de nitrógeno, pero se incorporó posteriormente la sesbania como abono verde, por su beneficiosa contribución a la movilización de nutrientes y al mejoramiento de las condiciones del suelo. Aquí también se alternan los sistemas de raíces, iniciando con una planta de raíces fasciculadas seguida de otras dos con sistemas de raíces pivotante, mientras que en el experimento 4 nuevamente se alternan los dos sistemas de raíces (arroz de secano y frijol). En todos los experimentos se incluyó, al menos, un cultivo con residuos de alta relación C/N con vistas mejorar el contenido de materia orgánica del suelo.

**Tabla 5. Descripción del experimento 3**

Cultivos (Variedad)	Frecuencia de inoculación de HMA	Rizobacterias aplicadas	Fecha y marco de siembra (m)
Maíz (FranciscoMj)	F0 No inoculado	No inoculado	Julio 0,90 x 0,20
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	
Tomate (Amalia)	F0 No inoculado	No inoculado	Diciembre 1,40 x 0,30
	F1 No inoculado	<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	
	F2 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	
	F2 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	
Sesbania	F0 No inoculado	No inoculado	Abril 0,45 x 0,05
	F1 No inoculado	<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	
	F2 No inoculado	<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	
	F3 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	

**Tabla 6. Descripción del experimento 4**

Cultivos (Variedad)	Frecuencia de inoculación de HMA	Rizobacterias aplicadas	Fecha y marco de siembra (m)
Arroz de secano (LP7)	F0 No inoculado	No inoculado	Julio 0,45 x 0,05
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense (Sp7)</i>	
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense (Sp7)</i>	
	F1 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense (Sp7)</i>	
Frijol (Bolita 42)	F0 No inoculado	No inoculado	Diciembre 0,70 x 0,05
	F1 No inoculado	<i>Rhizobium phaseolus</i>	
	F2 <i>Glomus clarum</i>	<i>Rhizobium phaseolus</i>	
	F2 <i>Glomus clarum</i>	<i>Rhizobium phaseolus</i>	
Boniato (Cemsa78-354)	F0 No inoculado	No inoculado	Abril 0,90 x 0,30
	F1 No inoculado	<i>Azospirillum brasilense (Sp7)</i>	
	F2 No inoculado	<i>Azospirillum brasilense (Sp7)</i>	
	F3 <i>Glomus clarum</i>	<i>Azospirillum brasilense (Sp7)</i>	

### 3.3 Inoculación de los microorganismos.

La cepa de HMA utilizada (*Glomus clarum*), se obtuvo a partir de inóculo micorrízico certificado (Fernández y col., 2001) producido en el Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas del INCA, que contenía 250 esporas. g<sup>-1</sup>. Las poblaciones por g de soporte sólido en los inóculos de rizobacterias, también provenientes del cepario del INCA, fueron: *Rhizobium*: 1 x 10<sup>8</sup> ufc, *Azospirillum brasilense* Sp 7: 3,55 x 10<sup>9</sup> ufc y *Burkholderia cepacia* 0057: 3,24 x 10<sup>9</sup> ufc. El soporte sólido utilizado fue turba molinada, tamizada y estéril.

Para los cultivos propagados por semillas, la inoculación se realizó por el método de recubrimiento de las mismas, según Fernández (1997), inoculando en primer lugar las bacterias e inmediatamente después el hongo. Para las primeras se empleó una cantidad correspondiente al 2 % de la masa total de las semillas, mientras para la inoculación del hongo se tomó el 10 % de esa masa. En la inoculación del boniato se realizó la mezcla de los biofertilizantes fúngico y bacteriano, en una relación 5:1, y se adicionó agua y sacarosa hasta conseguir una pasta con la densidad suficiente para adherirse a los propágulos por el extremo inferior, hasta una longitud de 10 cm.

### 3.4 Preparación del suelo y labores de cultivo.

Para todos los experimentos, el tratamiento correspondiente a cada parcela experimental se mantuvo constante en todos los cultivos que conformaban la secuencia. La preparación del suelo se realizó con dos pases de arado de disco (rotura y cruce), un pase de grada y surcado para la siembra. Todas las especies vegetales recibieron labores de cultivo y escardas entre los 30 y 60 días después de la siembra, según las normas técnicas para cada una de ellas, con las excepciones del arroz y la sesbania por sus marcos de plantación, aunque recibieron, al igual que las demás, dos escardas manuales con azada. El riego se aplicó según las normas técnicas vigentes para cada cultivo y para el arroz se realizaron los riegos de establecimiento del cultivo en las fases de espigamiento y de llenado del grano.

Dados los satisfactorios contenidos de fósforo y potasio asimilables que arrojaron los análisis de suelo (Tabla 1), sólo se aplicó fertilización nitrogenada (urea), utilizando las dosis completas recomendadas para cada cultivo en el tratamiento testigo no inoculado (F0) y sólo se aplicó el 60 % de dichas dosis en los tratamientos inoculados (F1, F2 y F3), con la excepción de las leguminosas, donde el porcentaje adicionado fue menor y en dependencia de la especie, tal como aparece reflejado en la Tabla 7.

**Tabla 7. Dosis de N (kg.ha<sup>-1</sup>) aplicadas a los cultivos en los diferentes experimentos.**

Tratam.	Soya	Maíz	Boniato	Girasol	Sorgo	Tomate	Arroz	Sesbania	Frijol
Testigo	200	120	90	110	100	150	120	30	120
Inoculados	30	72	54	66	60	90	54	30	50

La incorporación de *Sesbania rostrata* como abono verde, se realizó a los 60 días después de la siembra, mediante corte de la parte aérea de las plantas en cada parcela y posterior desmenuzamiento e incorporación al suelo, utilizando un arado de discos y 30 días después de ese proceso se procedió a la siembra del cultivo posterior (maíz).

### 3.5 Evaluaciones realizadas.

#### 3.5.1 Análisis de tejidos vegetales.

- Masa fresca y seca total (t.ha<sup>-1</sup>), se realizó a los 60 días después de la germinación, por pesada y secado en estufa a 65 °C hasta masa

constante, a 2 muestras por réplica de cada tratamiento, compuestas cada una por 15 plantas y extrapolando los resultados a 1 ha.

- Contenido de N, P y K (%), por digestión húmeda con  $H_2SO_4 + Se$ , según el método Kjeldahl y determinación colorimétrica con el reactivo de Nessler y el azul de molibdeno para N y P, respectivamente, y determinación por fotometría de llama para el K.
- Extracción de N, P y K ( $kg. ha^{-1}$ ), por cálculo a partir de la masa seca y los contenidos de cada nutriente, según la fórmula:

$$Extracción (kg. ha^{-1}) = \frac{Masa\ seca (kg. ha^{-1}) \times Contenido\ nutriente\ (\%)}{100}$$

### 3.5.2 Análisis de suelo.

#### Químicos.

Se tomaron dos muestras compuestas en el área de cálculo de cada parcela, a una profundidad de 0-20 cm, al final del ciclo vegetativo de las plantas, a las cuales se les determinaron, en el laboratorio del INCA, los siguientes índices:

- pH ( $H_2O$ ), por el método potenciométrico, con relación suelo: solución de 1:2,5.
- M.O (%), por el método de Walkley and Black.
- P asimilable ( $mg.g^{-1}$ ), por extracción con  $H_2SO_4$  0,1 N con relación suelo: solución 1:2,5.
- $K^+$  intercambiable ( $cmol.kg^{-1}$ ), por extracción con acetato de amonio 1 N a pH 7 y determinación por fotometría de llama.

#### Físicos:

Las muestras se tomaron anualmente, al final de cada secuencia de cultivos, a una profundidad de 0-20 cm, determinando, según Kaurichev (1984): la densidad aparente (método del cilindro), la densidad real (método del picnómetro), la microestructura y el análisis del tamaño de los agregados en seco y húmedo (método de Savvinov), la textura (método de Kachinski), el coeficiente de dispersión (Kd) y el índice de estabilidad (Ie), calculados por las siguientes fórmulas:

$$Kd = \frac{\% \text{ arcillas en microestructura}}{\% \text{ arcillas en textura}}$$

$$Ie = \frac{\sum \% Ag > 0,25 \text{ mm (th)}}{\sum \% Ag > 0,25 \text{ mm (ts)}}$$

donde Ag = agregados; th = tamizado en húmedo y ts = tamizado en seco.

### 3.5.3 Análisis microbiológicos.

#### 3.5.3.1 Variables micorrízicas.

- Colonización micorrízica: Se tomaron muestras compuestas de raicillas de 15 plantas de cada parcela a los 60 días después de la germinación. Para las determinaciones se tomaron aproximadamente 200 mg de raicillas por tratamiento 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: Se realizó según metodología descrita por Trouvelot y col. (1986).
- Conteos de esporas: Se procedió según la modificación realizada por Herrera y col. (1995) del protocolo descrito por Gerdemann y Nicholson (1963), tomando muestras compuestas a partir del suelo rizosférico de 15 plantas.

#### 3.5.3.2 Conteos de poblaciones de rizobacterias.

Los medios de cultivo y las condiciones para lograr el conteo de las poblaciones bacterianas en la rizosfera ( $\text{ufc.g}^{-1}$  suelo rizosférico), fueron los convencionales, según los métodos descritos por Bashan y col. (1996), los que aparecen descritos en la Tabla 8.

**Tabla 8. Medios y condiciones empleados para el conteo de las poblaciones de bacterias en la rizosfera de los cultivos.**

Géneros	Medio de cultivo	Incubación	Referencias
<i>Azospirillum</i>	Nfb	96 h – 37 °C	Day y Döbereiner (1976), según Bashan y col. (1996)
	Rojo congo	72 h – 37 °C	
<i>Burkholderia</i>	King B	24 h – 40 °C	King y col. (1954), según Bashan y col. (1996)

El conteo de las poblaciones bacterianas se realizó a los 60 días después de la germinación en la rizosfera de las plantas.

#### 3.5.4 Rendimientos agrícolas.

Para la evaluación del rendimiento, la producción agrícola de cada cultivo en cosecha se midió por pesada directa en el área de cálculo de cada parcela y se

expresó en  $\text{kg. ha}^{-1}$ . En sesbania se tomó como rendimiento la producción de masa fresca.

### 3.6 Análisis estadístico.

Todos los resultados experimentales fueron sometidos a Análisis de Varianza según el diseño estadístico empleado y, en los casos que existieron diferencias significativas entre las medias de tratamientos, se utilizó como criterio discriminante la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey, según Lerch (1977). Los datos originales correspondientes a las variables población de cada rizobacteria ( $\text{ufc. g}^{-1}$  suelo rizosférico) y colonización micorrízica (%) fueron transformados con las funciones **log x** y **arcsen  $\sqrt{\%}$** , respectivamente, para el posterior análisis de varianza. Se realizaron análisis factoriales para el contenido de esporas, materia orgánica, pH y extracciones de nitrógeno, fósforo y potasio, donde el factor A fue el cultivo empleado, el B la frecuencia de inoculación y C los años de estudio.

El análisis multivariado factorial discriminante se realizó utilizando como variables los parámetros micorrízicos, las extracciones de nutrientes, el rendimiento, la producción de materia seca y los índices del estado estructural de suelo; como individuos se tomaron las medias anuales de las diferentes frecuencias de inoculación en los cultivos de todos los experimentos.

### 3.7 Análisis económico.

La valoración económica de los resultados de los experimentos, a partir de cada uno de los cultivos en cada secuencia, se realizó según la metodología propuesta por la FAO (1980), evaluando los siguientes indicadores:

- Valor de la producción ( $\$. \text{ha}^{-1}$ ): Rendimiento del cultivo multiplicado por el precio de venta de una tonelada de producto.
- Costos de fertilización ( $\$. \text{ha}^{-1}$ ): Gastos incurridos por la aplicación de los fertilizantes minerales y/o los biofertilizantes empleados.
- Beneficio ( $\$. \text{ha}^{-1}$ ): Ganancia neta obtenida por diferencia entre el valor de la producción y los costos de aplicación de los fertilizantes minerales y/o biofertilizantes.
- Relación B/C: Cociente obtenido de dividir el beneficio entre el costo total incurrido en las diferentes actividades en cada tratamiento. Valores de la relación B / C mayores a 1 indican el aporte de ganancia y un valor de 2 la obtención de un beneficio del 100 %. Valores de 3 o superiores corresponden a ganancias muy notables (FAO, 1980).

Para el cálculo de estos indicadores, se utilizó como información básica:

1) Precios de los fertilizantes minerales (\$·t<sup>-1</sup>).

- Urea..... 273,40

2) Precios de venta de biofertilizantes (\$·kg<sup>-1</sup>), según Listado de Precios del INCA (Cuba INCA, 2000)

- *Azospirillum brasilense*..... 20,00  
 - *Bulkholderia. cepacia*..... 36,00  
 - EcoMic (HMA)..... 2,50  
 - *Rhizobium*..... 26,00

3) Precios de producto acopiado (\$·t<sup>-1</sup>), según Listado Oficial de Precios MINAG (Cuba MINAG, 2002).

- Soya..... 424,00  
 - Girasol..... 190,00  
 - Sorgo..... 136,90  
 - Maíz..... 326,00  
 - Tomate..... 347,80  
 - Boniato..... 304,00  
 - Frijol..... 5 435,00  
 - Arroz..... 739,10

4) Tarifas de preparación de suelos (\$·ha<sup>-1</sup>), según Listado Oficial de Precios de Servicios Agropecuarios y Resolución No. 244-99 del MINAG (Cuba MINAG, 1999).

- Rotura 31,60  
 - Cruce 17,28  
 - Grada de 965 kg 4,80  
 - Surcar 17,28  
 - Siembra de granos 56,21  
 - Cultivo 14,75  
 - Fumigación 12,08

5) Precios de las semillas adquiridas (\$·kg<sup>-1</sup>), según Listado Oficial de Precios de Semillas del MINAG (Cuba MINAG, 2002).

- Girasol 5,60

- Soya	3,04	
- Sorgo	3,26	
- Maíz	5,95	
- Frijol	13,20	
- Tomate	217,47	
- Arroz		7,50
- Sesbania	0,15	
- Boniato	5,0	(millar de esquejes)

## IV. Resultados y Discusión

### 4.1 Efectos de la inoculación con HMA y rizobacterias en la producción vegetal.

#### 4.1.1 Producción de masa seca.

En los experimentos 1 y 2 (Tabla 9), los valores de producción de masa seca alcanzados por la soya no reflejaron diferencias significativas entre frecuencias de inoculación, evidenciando que las condiciones naturales del suelo fueron suficientes para garantizar una adecuada producción de masa seca con mínima utilización de fertilizantes nitrogenados. Por el contrario, en los cultivos de maíz y boniato, siempre que se inoculó al menos dos cultivos (F2 y F3), los valores alcanzados fueron significativamente superiores al testigo y a la inoculación de sólo el primer cultivo (F1). Similar comportamiento mostraron el girasol y el sorgo. Para este último cultivo, Álvarez (1999) encontró valores similares de producción de masa seca bajo condiciones edafoclimáticas similares.

**Tabla 9. Efecto de la frecuencia de inoculación con HMA y rizobacterias en la producción de masa seca ( $t \cdot ha^{-1}$ ) por los cultivos en los experimentos 1 y 2.**

<b>Experimento 1</b>	<b>Soya</b>		<b>Maíz</b>		<b>Boniato</b>	
<b>Frecuencia</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>
F0	4,20	4,30	9,87 b	9,70 b	8,20 b	8,25 bc
F1	4,30	4,25	9,95 b	10,05 b	8,00 b	7,72 c
F2	4,30	4,20	10,75 a	10,55 a	9,12 a	9,40 ab
F3	4,40	4,40	10,87 a	10,82 a	9,62 a	9,52 a
ES <sub>x</sub>	0,09	0,11	0,09**	0,17**	0,20**	0,17**
<b>Experimento 2</b>	<b>Soya</b>		<b>Girasol</b>		<b>Sorgo</b>	
<b>Frecuencia</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>
F0	4,30	4,35	6,10 b	6,50 b	6,80 b	7,80 c
F1	4,30	4,45	6,10 b	5,52 b	7,40 b	7,90 bc
F2	4,30	4,42	6,80 a	7,37 a	7,55 ab	8,50 ab
F3	4,20	4,40	7,00 a	7,62 a	7,77 a	8,80 a
ES <sub>x</sub>	0,06	0,06	0,09**	0,25**	0,12**	0,11**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey a  $p \leq 0,01$

En los experimentos 3 y 4 (Tabla 10), se observa que la mayoría de los cultivos mostraron una tendencia al aumento de la producción de masa seca en el segundo año, con las excepciones del tomate y del arroz, mientras que el maíz y el arroz no mostraron diferencias significativas entre las frecuencias de inoculación, aunque sí en relación al testigo no inoculado. Los demás cultivos

(tomate, sesbania, frijol y boniato) alcanzaron o mostraron tendencia a alcanzar valores significativamente superiores de masa seca cuando se inocularon los dos primeros cultivos de cada secuencia, al igual que ocurrió en los experimentos 1 y 2. Todo lo anterior evidencia la influencia positiva, en general, de la coinoculación con HMA y rizobacterias en la producción de masa seca, muy probablemente a través del mejoramiento de la nutrición vegetal de las plantas. Estos resultados coinciden con los trabajos de Liu y col. (2002) los que encontraron correlaciones positivas entre la micorrización y el incremento de la producción de biomasa en plantas de maíz.

**Tabla 10. Efecto de la frecuencia de inoculación con HMA y rizobacterias en la producción de masa seca ( $t\cdot ha^{-1}$ ) por los cultivos en los experimentos 3 y 4.**

<b>Experimento 3</b>	<b>Maíz</b>		<b>Tomate</b>		<b>Sesbania</b>	
<b>Frecuencia</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>
F0	9,25 b	9,61 b	7,08 b	7,09 c	7,89 b	8,10 c
F1	10,83 a	11,60 a	7,11 b	6,87 c	8,44 b	8,70 b
F2	11,10 a	11,50 a	8,39 a	7,93 b	9,36 a	9,72 ab
F3	10,75 a	11,70 a	8,31 a	8,50 a	9,61 a	9,90 a
ESx	0,28**	0,22**	0,11**	0,17**	0,18**	0,21
<b>Experimento 4</b>	<b>Arroz</b>		<b>Frijol</b>		<b>Boniato</b>	
<b>Frecuencia</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>	<b>Año I</b>	<b>Año II</b>
F0	4,32 b	4,27	3,32 b	3,97 b	8,52 b	8,79 b
F1	4,78 a	4,37	3,28 b	3,49 b	8,30 b	9,08 b
F2	4,80 a	4,48	3,85 a	4,39 a	10,16 a	10,18 ab
F3	4,80 a	4,72	4,04 a	4,78 a	10,59 a	10,66 a
ESx	0,06**	0,21	0,06**	0,16**	0,20**	0,21**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey a  $p \leq 0,01$

#### 4.1.2 Rendimientos agrícolas.

Al analizar los resultados correspondientes a los experimentos 1 y 2 en lo referente a los rendimientos agrícolas alcanzados (Tabla 11), se encontró que para la soya, en el primer año, no hubo efectos en relación con el testigo, mientras que, en el segundo año, el rendimiento del testigo fue significativamente inferior al de los tratamientos coinoculados con HMA y *B. japonicum*. Este comportamiento pudo haber estado influido por las fuertes lluvias que se presentaron en el periodo de máxima demandas del cultivo durante el primer año experimental (Fig. 1), que pudo aumentar el lavado del nitrógeno y disminuir la eficiencia del cultivo en el uso de este elemento. Al mismo tiempo, se hizo evidente que dicha coinoculación fue eficiente en la fijación y utilización del nitrógeno atmosférico (Sanginga y col.,

1999). Estos resultados confirman que los hongos MA no se asocian con las bacterias de forma aleatoria, sino que, por el contrario, lo hacen según una estructura jerárquica de preferencia mutua, como señalaron Andrade y col. (2001). En los restantes cultivos, los mayores rendimientos se alcanzaron cuando, al menos, fueron inoculados los dos primeros cultivos de cada secuencia, mostrando similar comportamiento en el segundo año, aunque ligeramente superiores al primero. En todos los casos se obtuvieron mayores rendimientos en el segundo año experimental.

**Tabla 11. Efecto de la frecuencia de inoculación con HMA y rizobacterias en los rendimientos ( $t \cdot ha^{-1}$ ) de los cultivos en los experimentos 1 y 2.**

Experimento 1	Soya		Maíz		Boniato	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	1,82	1,95 b	5,04 b	5,25 c	18,50 b	22,10 b
F1	1,81	2,18 a	5,07 b	5,57 b	18,80 b	22,90 b
F2	1,87	2,17 a	5,49 a	5,75 a	21,25 a	24,50 a
F3	1,86	2,37 a	5,46 a	5,87 a	22,70 a	25,10 a
ES <sub>x</sub>	0,05 ns	0,08**	0,10**	0,11**	0,62**	0,59**
Experimento 2	Soya		Girasol		Sorgo	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	1,92	1,91 b	1,69 b	1,82 c	1,90 b	2,32 b
F1	1,95	2,21 a	1,60 b	1,85 bc	1,80 b	2,34 b
F2	1,93	2,27 a	1,91 a	2,10 ab	2,19 a	2,73 a
F3	1,94	2,37 a	1,85 a	2,12 a	2,23 a	2,82 a
ES <sub>x</sub>	0,02 ns	0,07**	0,03**	0,08**	0,09**	0,02**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey a  $p \leq 0,01$

En los experimentos 3 y 4 (Tabla 12), el maíz en el primer año y el arroz en ambos años sólo manifestaron diferencias significativas entre los tratamientos coinoculados con HMA y *A. brasilense*, y el testigo no inoculado, siendo los rendimientos del maíz superiores en el segundo año, después de la incorporación de la sesbania como abono verde. El cultivo del arroz alcanzó en el testigo rendimientos inferiores, debido posiblemente al mejor balance de las comunidades biológicas que las plantas inoculadas mantienen en su rizosfera y que garantizan mejores condiciones para su adaptación al medio.

El tomate mantuvo tendencias similares en ambos años y se encontraron valores significativamente superiores en los tratamientos donde, al menos, se inocularon dos cultivos precedentes y que se corresponden con los tratamientos con mayores contenidos de nutrientes; Terry y Pino (2002) encontraron en este

cultivo los valores más elevados del rendimiento cuando lo inocularon con *Glomus clarum* y *Azospirillum brasilense*. Además, Poulton y col. (2002) encontraron que la micorrización no sólo aumentó el contenido foliar de fósforo, sino también algunos otros parámetros reproductivos como el número total de flores y la producción de frutos por plantas.

Los cultivos de frijol y boniato mantuvieron una tendencia al aumento de los rendimientos en la misma medida del aumento de la frecuencia de inoculación, resultado similar al obtenido por Ruiz (2001) al inocular un solo cultivo en rotaciones de raíces y tubérculos.

**Tabla 12. Efecto de la frecuencia de inoculación de HMA y rizobacterias en los rendimientos ( $t \cdot ha^{-1}$ ) de los cultivos en los experimentos 3 y 4.**

Experimento 3	Maíz		Tomate		Sesbania	
Frecuencia	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	5,10 b	5,23 b	21,80 b	20,02 b	26,90 c	27,40 b
F1	5,56 a	5,45 b	23,00 b	20,70 b	28,30 bc	25,60 b
F2	5,88 a	6,03 a	26,40 a	25,10 a	31,40 ab	30,20 a
F3	5,83 a	6,10 a	26,70 a	26,20 a	32,20 a	31,05 a
ES <sub>x</sub>	0,12**	0,11**	0,60**	0,54**	1,01**	0,62 **
Experimento 4	Arroz		Frijol		Boniato	
Frecuencia	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	1,07 b	1,10 b	1,45 b	1,72 b	21,40 c	23,60 b
F1	1,30 a	1,22 a	1,48 b	1,70 b	22,30 c	24,30 b
F2	1,29 a	1,26 a	1,74 a	1,80 a	25,60 b	26,40 a
F3	1,28 a	1,24 a	1,71 a	1,85 a	27,00 a	27,30 a
ES <sub>x</sub>	0,03**	0,02**	0,04**	0,02**	0,65**	0,40**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey a  $p \leq 0,01$

Estos resultados evidencian que el comportamiento, tanto de la producción de materia seca como de los rendimientos agrícolas fueron condicionados por el funcionamiento de la asociación de las plantas con los microorganismos inoculados, por lo que la discusión de este último aspecto, que se abordará a continuación, permitirá ampliar la comprensión de dichos resultados.

## 4.2 Efectos en el funcionamiento de la asociación hongo-bacteria-planta.

### 4.2.1 Variables de colonización fúngica.

Al analizar el comportamiento de la colonización micorrízica en el experimento 1, soya-maíz-boniato, (Tabla 13), se observó que en la soya, durante el primer año, se alcanzaron valores de colonización micorrízica significativamente superiores al del testigo en todos los tratamientos inoculados (F1, F2, F3), mientras que en el segundo ciclo, el valor alcanzado en la menor frecuencia de inoculación (F1), aunque superior al testigo, fue significativamente menor que en las frecuencias de inoculación superiores (F2 y F3), indicativo de la baja densidad y viabilidad de los propágulos que permanecieron en el suelo, los cuales no fueron suficientes para alcanzar valores de colonización similares a los tratamientos inoculados.

Sin embargo, al plantar el segundo y el tercer cultivo (maíz y boniato, respectivamente) se observa que ya el tratamiento inoculado en los dos primeros cultivos (F2) alcanzó una colonización suficientemente alta como para prescindir de una nueva inoculación en dicho tercer cultivo (F3), ya que no se encontraron diferencias significativas entre ambos. Smith y Read (1997), en numerosos estudios, han encontrado que una misma especie de hongo puede colonizar de forma diferente a sus plantas hospederas. Este comportamiento parece estar relacionado con el aumento de la cantidad de propágulos que se alcanza después de dos inoculaciones continuas. Allen (2001) señala que la colonización micorrízica es afectada por la cantidad de inóculos, su composición y la distribución de ellos en el suelo. Por otra parte, Klironomos y col. (1999) encontraron que tanto las hifas como las esporas tienen una alta variabilidad espacial y temporal en el suelo, lo que puede provocar baja colonización cuando las densidades de los propágulos son bajas.

**Tabla 13. Comportamiento de la colonización micorrízica y la densidad visual en el experimento 1.**

Soya						
Frecuencia	Colonización. Año I		Colonización. Año II		Densidad Visual (%)	
	(%)	$\arccos\sqrt{\%}$	(%)	$\arccos\sqrt{\%}$	Año I	Año II
F0	21,0	0,96 b	23,0	0,99 c	1,24 b	1,60 b
F1	39,0	1,33 a	38,3	1,32 b	4,40 a	4,80 a
F2	42,5	1,34 a	47,8	1,48 a	4,80 a	4,70 a
F3	39,2	1,33 a	45,5	1,50 a	4,60 a	4,80 a
ES <sub>x</sub>		0,05**		0,04**	0,25**	0,12**

<b>Maíz</b>						
F0	22,0	0,97 c	26,8	1,07 c	2,40 b	2,70 b
F1	33,7	1,23 b	40,0	1,36 b	2,70 b	2,90 b
F2	46,0	1,45 a	52,3	1,61 a	4,70 a	4,90 a
F3	44,2	1,44 a	56,0	1,69 a	4,90 a	5,30 a
ES <sub>x</sub>		0,05**		0,04**	0,40**	0,28**
<b>Boniato</b>						
F0	29,7	1,04 c	30,0	1,13 c	1,90 c	2,00 b
F1	34,0	1,24 b	39,8	1,36 b	3,08 bc	2,60 b
F2	55,5	1,70 a	60,8	1,78 a	4,99 ab	5,32 a
F3	60,5	1,78 a	66,3	1,90 a	5,60 a	5,85 a
ES <sub>x</sub>		0,04**		0,05**	0,39**	0,32**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey a  $p \leq 0,01$

En el segundo año de la aplicación de los tratamientos se observan aumentos aun mayores en los tratamientos con mayores frecuencias de inoculación, lo que puede ser explicado por el efecto adicional de los propágulos activos que quedan en el suelo después del primer año y que influyen adicionalmente en la colonización de los cultivos posteriores a través de las esporas, hifas y raíces infectadas. Klironomos y Hart (2002) demostraron que el genero *Glomus* presenta alta capacidad de colonización con los tres tipos de propágulos, es decir mediante hifas, esporas y raíces colonizadas. Sin embargo, las diferencias entre las frecuencias de inoculación mantienen un comportamiento similar al ya analizado para el primer año.

En cuanto a la variable densidad visual, esta alcanzó los mayores valores en el maíz y el boniato, coincidiendo con las frecuencias que provocaron mayor colonización micorrízica, mientras en las frecuencias F0 y F1 logran los más bajos valores de esta variable, corroborando la pobre utilización de los propágulos nativos de HMA y el bajo nivel de establecimiento de la simbiosis cuando en estas condiciones se inocula sólo el primer cultivo.

En la Tabla 14 se analizan la colonización micorrízica y la densidad visual para el experimento 2, soya-girasol-sorgo, observándose tendencias de comportamiento similares al ya analizado para el primer experimento; sin embargo, puede observarse que el sorgo, que fue precedido por el girasol con alto grado de colonización, no alcanzó altos niveles en esta variable, lo que indica que el rango de valores que se alcanza en esta variable tiene una relación directa con la especie de cultivo asociado. En este sentido, las plantas que poseen un sistema de raíces ramificado y de rápido crecimiento, en comparación con otras de pobre desarrollo, ante igual densidad de propágulos presentes, el % de colonización micorrízica resulta muy variable y, en general, es menor en aquellas plantas donde el sistema radical crece a un ritmo más acelerado, debido al

alejamiento de las nuevas raíces del punto de inoculación y también a que una mayor proporción de raíces no son alcanzadas por las hifas corredoras, las cuales colonizan las nuevas raíces en crecimiento.

Estos resultados coinciden con los de Sanders y Fitter (1992), que encontraron una diferencia marcada del comportamiento de esta variable entre especies de plantas y los relacionaron con la variación en la estructura de los tejidos de la raíz, lo que provoca distintas restricciones sobre el desarrollo del hongo. Parke y Kaeppler (2000) señalan que las especies de cultivos pueden diferir marcadamente en su habilidad para responder a la micorrización y con la pérdida de esta capacidad también se pierden los beneficios que proporcionan estos microorganismos, mientras Allen (2001) encontró niveles de colonización mayores en especies de plantas con menor velocidad de desarrollo radical, utilizando iguales densidades de diferentes tipos de propágulos.

La densidad visual mostró similar comportamiento al de la colonización micorrízica en las diferentes frecuencias empleadas, lo que significó una mayor ocupación del hongo dentro de las raíces, como medida de su buen establecimiento. Los mayores valores se alcanzaron en girasol, mientras que sorgo alcanzó los menores valores, posiblemente por ser un cultivo de baja dependencia micorrízica. En relación con ese aspecto, Stuart y Howard (2001) señalan al sorgo entre los cultivos de baja dependencia micorrízica, mientras que maíz, soya y girasol aparecen en el grupo de alta dependencia.

**Tabla 14. Comportamiento de la colonización micorrízica y la densidad visual en el experimento 2.**

Soya						
Frecuencias	Colonización. Año I		Colonización. Año II		Densidad Visual (%)	
	(%)	$\arccos\sqrt{\%}$	(%)	$\arccos\sqrt{\%}$	Año I	Año II
F0	19,5	0,91 b	22,3	0,95 b	1,33 b	1,90 b
F1	40,0	1,42 a	48,5	1,54 a	4,60 a	4,80 a
F1	39,7	1,35 a	48,3	1,53 a	4,80 a	5,00 a
F1	42,7	1,36 a	50,0	1,57 a	4,70 a	5,20 a
ES <sub>x</sub>		0,06**		0,02**	0,20**	0,22**
Girasol						
F0	25,2	1,04 c	27,5	1,07 c	2,40 c	3,10 c
F1	46,7	1,44 b	43,5	1,43 b	5,80 b	5,60 b
F2	61,2	1,79 a	62,5	1,82 a	7,70 a	8,08 a
F2	61,0	1,78 a	63,8	1,84 a	8,01 a	8,70 a
ES <sub>x</sub>		0,04**		0,06**	0,24**	0,26**

Sorgo						
F0	23,7	1,01 b	20,5	1,03 c	0,70 b	0,82 c
F1	34,7	1,25 b	40,8	1,38 b	1,10 b	1,87 bc
F2	48,2	1,60 a	50,5	1,53 ab	3,10 a	3,12 ab
F3	54,7	1,70 a	56,5	1,74 a	3,74 a	3,95 a
ES <sub>x</sub>		0,06**		0,07**	0,21**	0,26**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey a  $p \leq 0,01$

En ambos experimentos, la colonización micorrízica alcanzada por el tratamiento testigo aumentó con la inclusión de los diferentes cultivos, pero los valores más altos se encontraron también en los cultivos más dependientes, lo que indica que la micorrización nativa puede aumentar con la inclusión de diferentes cultivos micotróficos, aunque, bajo las condiciones en que se desarrollaron dichos experimentos, los valores alcanzados fueron muy bajos y no tuvieron una marcada influencia en la nutrición y desarrollo de los cultivos, todos de ciclo corto, lo que puede haber estado condicionado por la dispersión y pérdida de viabilidad de los propágulos por las continuas actividades de laboreo.

En el experimento 3, en la secuencia maíz–tomate–sesbania (Tabla 15), todos los cultivos alcanzaron mayores niveles de colonización micorrízica cuando se emplearon las frecuencias más altas de inoculación. En el tomate y la sesbania siempre se encontraron diferencias en la colonización micorrízica entre las frecuencias F0 y F1, siendo superior en F1, indicando que se incrementaron los niveles de propágulos en el suelo, pero alcanzando niveles de colonización inferiores a los logrados en las frecuencias F2 y F3. Sin embargo, para la densidad visual no se encontraron diferencias entre las frecuencias F0 y F1, lo que puede ser reflejo del inicio más tardío de la simbiosis y de un retraso en la fase logarítmica del proceso de colonización, disminuyendo la ocupación del hongo dentro de las raíces de las plantas.

**Tabla 15. Comportamiento de la colonización micorrízica y la densidad visual en el experimento 3.**

Maíz						
Frecuencias	Colonización. Año I		Colonización. Año II		Densidad Visual (%)	
	(%)	$\arcsin\sqrt{\%}$	(%)	$\arcsin\sqrt{\%}$	Año I	Año II
F0	25,3	1,03 b	29,3	1,13 b	1,24 b	1,60 c
F1	60,8	1,78 a	54,3	1,71 a	6,80 a	4,02 b
F1	68,0	1,93 a	62,0	1,81 a	7,05 a	5,40 a
F1	62,3	1,81 a	60,5	1,80 a	6,90 a	6,00 a
ES <sub>x</sub>		0,09**		0,05**	0,37**	0,36**
Tomate						
F0	21,3	0,94 c	26,5	1,01 c	0,65 b	0,84 b
F1	32,8	1,21 b	31,8	1,19 b	0,80 b	1,09 b
F2	65,0	1,98 a	50,5	1,59 a	6,59 a	5,22 a
F2	65,8	1,87 a	52,5	1,62 a	6,79 a	5,19 a
ES <sub>x</sub>		0,07**		0,03**	0,36**	0,16**
Sesbania						
F0	14,8	0,78 c	19,5	0,85 c	0,36 b	0,65 b
F1	35,3	1,34 b	34,8	1,25 b	2,07 b	2,05 b
F2	55,0	1,71 a	58,0	1,71 a	4,98 a	4,42 a
F3	57,5	1,72 a	61,8	1,80 a	6,65 a	5,67 a
ES <sub>x</sub>		0,06**		0,07**	0,41**	0,23**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey a  $p \leq 0,01$

En la Tabla 16 se muestra, para el experimento 4 (secuencia arroz–frijol–boniato), que tanto en el arroz como en el frijol se alcanzaron valores de colonización micorrízica inferiores a los logrados en el boniato, pero también se hizo evidente el efecto de las frecuencias de inoculación sobre los cultivos que son plantados posteriormente. En los tres cultivos la densidad visual aumentó con el aumento de la colonización y se manifestó un comportamiento ascendente en el segundo año, a diferencia de lo ocurrido en el experimento 3 (maíz–tomate–sesbania).

Lo anterior evidencia que el post-efecto de la aplicación de los hongos MA se manifestó en todos los cultivos en estudio, pero la intensidad del mismo estuvo en función de su posición en la secuencia y de su dependencia micorrízica. Por otra parte, la intensidad del laboreo bajo estos sistemas puede provocar un efecto de dilución de los propágulos en el suelo o la inactivación de algunos de ellos por la inversión del prisma de suelo, que expone los propágulos al efecto de la luz solar directa y a altas temperaturas, con lo cual disminuye la capacidad para mantener una adecuada proporción de propágulos activos en el suelo, capaces de lograr altos porcentajes de colonización. Así, Miller y col. (1995) demostraron en

maíz que la alteración del suelo redujo la colonización, la absorción de fósforo y su crecimiento debido a la ruptura de la red de micelios externos, con la consiguiente disminución de la efectividad de los propágulos. Estos efectos fueron mucho menores en aquellos suelos donde no se realizaron alteraciones mecánicas de los mismos.

**Tabla 16. Comportamiento de la colonización micorrízica y la densidad visual en el experimento 4.**

Arroz						
Frecuencias	Colonización. Año I		Colonización. Año II		Densidad Visual (%)	
	(%)	$\arcsin\sqrt{\%}$	(%)	$\arcsin\sqrt{\%}$	Año I	Año II
F0	31,8	1,07 b	33,0	1,20 b	1,94 b	0,63 b
F1	48,5	1,53 a	43,0	1,43 a	2,11a	2,06 a
F1	47,0	1,50 a	52,0	1,60 a	2,20 a	2,34 a
F1	49,5	1,56 a	51,0	1,59 a	2,25 a	2,40 a
ES <sub>x</sub>		0,06**		0,04**	0,20**	0,19**
Frijol						
F0	15,0	0,78 c	18,0	0,86 c	0,39 b	0,72 b
F1	31,1	1,17 bc	31,0	1,17 b	0,54 b	1,08 b
F2	44,5	1,45 ab	49,5	1,56 a	2,03 a	2,89 a
F2	49,3	1,55 a	53,0	1,63 a	2,12 a	3,04 a
ES <sub>x</sub>		0,06**		0,06**	0,21**	0,28**
Boniato						
F0	39,0	1,33 b	38,8	1,33 b	1,15 b	1,66 c
F1	41,0	1,39 b	44,0	1,47 b	2,16 b	2,41 b
F2	65,0	1,87 a	66,3	1,90 a	5,00 a	5,56 a
F3	72,0	2,02 a	65,8	1,89 a	5,49 a	6,05 a
Es <sub>x</sub>		0,07**		0,07**	0,34**	0,36**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey a  $p \leq 0,01$

Si bien es cierto que los valores del porcentaje de colonización micorrízica pueden disminuir en aquellos cultivos con abundante cantidad de raíces y rápido crecimiento de las mismas, por el desbalance entre la velocidad de colonización y la proliferación de nuevas raíces, debe enfatizarse que, en relación con el aprovechamiento del post-efecto micorrízico, el intenso crecimiento de las raíces es favorable para su aprovechamiento por dichas especies vegetales, ya que sus raíces exploran más volumen de suelo, disminuyendo el tiempo en que los propágulos metabólicamente activos se encuentran fuera del alcance de las raíces, las que entran en contacto con un número mayor de propágulos que se encuentran distribuidos en todo el volumen del suelo adyacente.

### Diferencias por efecto de las frecuencias de inoculación utilizadas.

El análisis de la Tabla 17 para las diferencias del nivel de colonización micorrízica entre la menor frecuencia de inoculación (F1) y la colonización nativa (F0) mostró incrementos que oscilaron entre 4 y 13 % para el experimento 1 y entre 11 y 21 % para el experimento 2. El boniato, aunque logró un elevado nivel de colonización, presentó los valores más bajos de incremento con relación al testigo (F0), debido a la más baja colonización que logra cuando sólo se inocula al primer cultivo (F1) y similar a la que alcanza con la micorrización nativa, debido, muy probablemente, a la pérdida progresiva de la capacidad infectiva de los propágulos en el suelo cuando sólo inoculamos al primer cultivo de la secuencia.

En todos los experimentos, las diferencias encontradas para la colonización entre las frecuencias F1 y F2 de los cultivos oscilaron entre 19 y 25 %, con la excepción del sorgo donde los valores encontrados fueron más bajos, sin embargo las diferencias entre las frecuencias de inoculación F2 y F3 fueron inferiores al 9 % indicando la gran similitud en los resultados de la colonización micorrízica para ambas frecuencias de inoculación.

**Tabla 17. Diferencias en los valores de la colonización micorrízica (%) a partir del segundo cultivo por efecto de las frecuencias de inoculación con HMA.**

Frecuencia	Experimento 1				Experimento 2			
	Maíz		Boniato		Girasol		Sorgo	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F1-F0	11,7	13,2	4,3	5,8	21,5	16,0	11,0	14,3
F2-F1	12,3	12,3	21,5	25,0	14,5	19,0	13,5	12,7
F3-F2	1,8	3,7	5,0	6,5	0,2	1,3	6,5	9,0
Frecuencia	Experimento 3				Experimento 4			
	Tomate		Sesbania		Frijol		Boniato	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F1-F0	11,5	5,3	20,5	15,3	16,1	13,0	2,0	5,2
F2-F1	32,2	18,7	19,7	23,2	13,4	18,5	24,0	22,3
F3-F2	0,8	2,0	2,5	3,8	4,8	3,5	7,0	0,5

Respecto a la densidad visual (Tabla 18), el comportamiento de las diferencias fue similar al ya descrito para la colonización micorrízica, alcanzándose nuevamente los mayores valores entre las frecuencias F1 y F0 y entre F2 y F1, evidenciándose la alta correspondencia entre las dos variables para todos los cultivos estudiados.

**Tabla 18. Diferencias en los valores de densidad visual (%) a partir del segundo cultivo por efecto de las frecuencias de inoculación con HMA.**

Frecuencia	Experimento 1				Experimento 2			
	Maíz		Boniato		Girasol		Sorgo	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F1-F0	0,3	0,2	1,2	0,6	3,4	2,5	0,4	1,0
F2-F1	2,1	2,0	1,9	2,7	1,9	2,4	2,1	1,2
F3-F2	0,1	0,4	0,5	0,5	0,3	0,6	0,6	0,8
Frecuencia	Experimento 3				Experimento 4			
	Tomate		Sesbania		Frijol		Boniato	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F1-F0	0,2	1,0	1,7	1,4	0,1	0,4	1,0	0,8
F2-F1	5,8	3,3	2,9	2,4	1,5	1,5	2,8	2,9
F3-F2	0,2	0,3	1,7	1,2	0,1	0,4	0,5	0,8

#### 4.2.2 Contenido de esporas de HMA en el suelo.

El análisis factorial del contenido de esporas de HMA en el suelo mostró interacción entre todos los factores estudiados, lo que permitió realizar la comparación entre las interacciones y graficar el comportamiento dinámico de esta variable durante los dos años estudiado.

En la Figura 2, para el experimento 1, se observó que en la frecuencia F3 hubo un continuo ascenso del contenido de esporas en el primer año, alcanzando los mayores valores el boniato, mientras en F2 se mantuvo el nivel de esporulación para el tercer cultivo a costa del post-efecto del cultivo anterior. En la frecuencia F1 descendieron los niveles de esporas en el suelo cuando no se inocularon los cultivos, aunque nunca se alcanzan los bajos niveles de la variante no inoculada (F0), que, aunque aumentan con la inclusión de los cultivos, mostró contenidos de esporas muy bajos.

Durante el segundo año de estudio, cuando se volvió a sembrar soya, la cantidad de esporas disminuyó para luego, en F3, ascender en los cultivos de maíz y boniato, mientras que con F2 y F1 se alcanzan los valores más elevados en maíz y soya, respectivamente, sin variaciones posteriores, indicando que el nivel de esporulación, entre otros factores, está condicionado por la especie de planta cultivada, aunque puede ser afectada también por las propiedades del suelo y las condiciones ambientales.

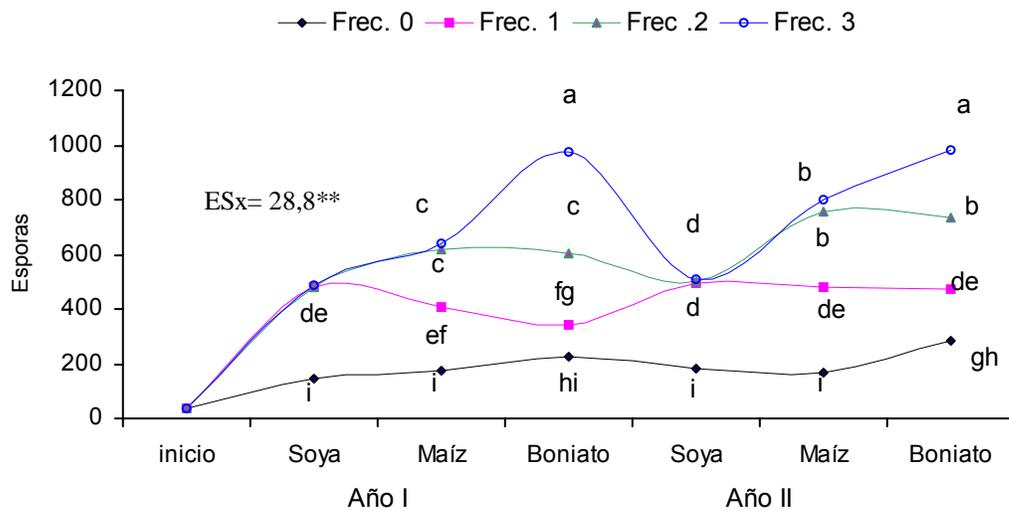


Figura 2. Dinámica del contenido de esporas en  $50 \text{ g}^{-1}$  suelo en el experimento 1.

En la Figura 3 (experimento 2) se observó el aumento del contenido de esporas en soya y girasol, pero sólo en las mayores frecuencias de inoculación (F2 y F3). Donde se inoculó sólo el primer cultivo (F1), el contenido de esporas descendió a causa de la baja colonización alcanzada en este tratamiento. En el sorgo se observó un descenso en todas las frecuencias de inoculación con relación al girasol, sin embargo, se debe destacar que este cultivo presenta un gran desarrollo radical, abarcando un mayor volumen de enraizamiento que, conjuntamente con su alta densidad de raíces permite que, aunque la cantidad de esporas por gramo de suelo sea menor que en otros cultivos, la cantidad de esporas que se incorporan a todo el volumen del suelo sea alta, lo que constituye un elemento importante para el incremento de la cantidad de propágulos en el suelo. Con independencia de lo señalado, las frecuencias F2 y F3 mantuvieron los mayores contenidos de esporas en el suelo.

En el segundo año se mantuvo una tendencia similar, pero con un número mayor de esporas, indicando la existencia de relaciones muy estrechas entre la producción de propágulos, su dispersión en la capa arable y su acumulación en el tiempo, lo que provocó un balance favorable para la colonización de cultivos posteriores en dependencia de la viabilidad de dichos propágulos.

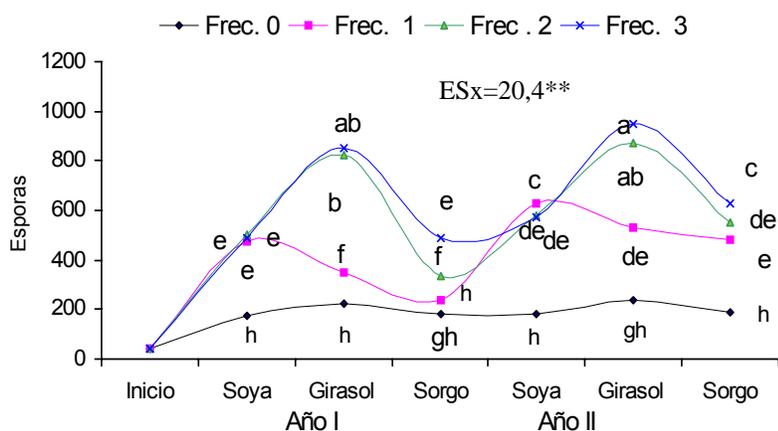


Figura 3. Dinámica del contenido de esporas en 50 g de suelo en el experimento 2

En la Figura 4, cuando se evaluó el experimento 3 (maíz–tomate–sesbania), se observan aumentos progresivos en los contenidos de esporas de los dos primeros cultivos, con un descenso significativo en sesbania. Al aplicar la inoculación sólo al primer cultivo (F1), se alcanzaron en el sorgo valores similares al del testigo no inoculado (F0), lo que demuestra un continuo deterioro del número de propágulos con el tiempo. Aunque con similar tendencia a aumentar la esporulación del hongo a medida que se incrementó la colonización, los valores de esta variable fueron inferiores en este cultivo. Este comportamiento parece estar dado por la incorporación del cultivo al suelo, como abono verde, antes de su estado de madurez fisiológica, lo que provocó que el hongo micorrízico no alcanzara la fase de máxima esporulación, e indicativo, además, de que en ese periodo vegetativo la producción de esporas es reducida. Al respecto, Sieverding (1991) plantea que en los cultivos anuales el número de esporas aumenta al finalizar el ciclo de los mismos.

Se debe destacar con relación a la sesbania que, cuando se inoculó sólo el primer cultivo se observó un descenso marcado en la cantidad de esporas, no encontrándose diferencias significativas con el testigo, lo que indica que el laboreo que se realiza al finalizar cada ciclo de cultivo puede tener un doble efecto: dilución del número de propágulos y muerte de los mismos por inversión del prisma de suelo, dada la consiguiente exposición al sol y a las altas temperaturas.

Kabir y col. (1997) encontraron que tanto la cantidad de esporas como la densidad de hifas metabólicamente activas disminuyeron progresivamente con el incremento de las alteraciones mecánicas al suelo. Jansa y col. (2002) demostraron que el laboreo del suelo tuvo un efecto significativo en la disminución de la esporulación de los hongos MA y el género *Glomus* fue más abundante en sistema de suelo bajo mínimo laboreo o no laboreo.

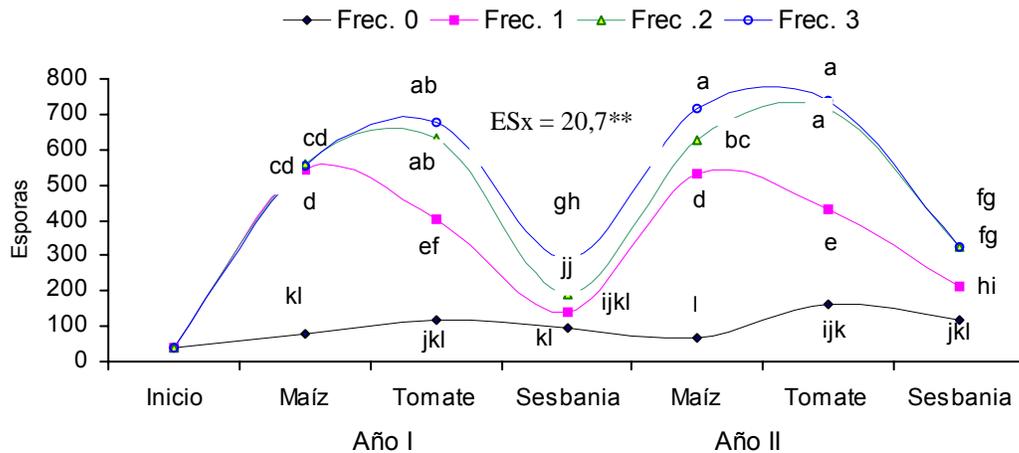


Figura 4. Dinámica del contenido de esporas en 50 g<sup>-1</sup> suelo en el experimento 3.

La Figura 5, para el experimento 4 (arroz–frijol–boniato), muestra que el contenido de esporas fue aumentando con la implantación de los cultivos, coincidiendo con el aumento de la colonización micorrízica en los cultivos sucesivos

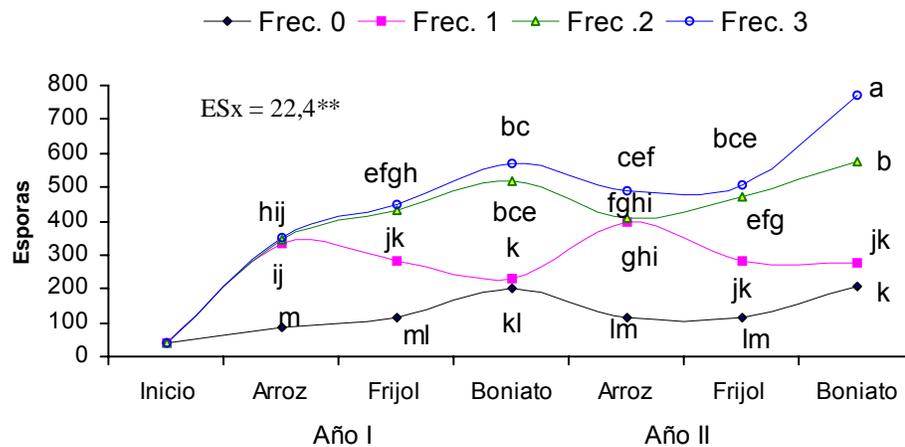


Figura 5. Comportamiento del contenido de esporas en  $50 \text{ g}^{-1}$  suelo en el experimento 4.

La producción de esporas por las micorrizas nativas (F0), aunque aumentó con la implantación de los cultivos con respecto a los valores iniciales del suelo, alcanzó valores significativamente inferiores al de todos los tratamientos donde se inoculó con el hongo MA. Las frecuencias F2 y F3 mantuvieron similar comportamiento hasta la inclusión del tercer cultivo de esa secuencia en el segundo año, donde F3 alcanzó mayor número de esporas. Estos resultados sugieren que, bajo el sistema de secuencias de cultivo, las aplicaciones de hongos micorrízicos deben ser frecuentes hasta lograr una estabilidad del número de propágulos que garantice una elevada colonización micorrízica con sus positivos efectos sobre el desarrollo de los cultivos.

En general, las variaciones encontradas en la producción de esporas pudieron estar influidas por las especies de plantas empleadas, pero su repercusión en los cultivos sucesivos pudo haber sido limitada también por el frecuente laboreo que se emplea en estos sistemas. Sanders y Fitter (1992) encontraron que la distribución de esporas de hongos MA dentro del suelo es extremadamente variable y las nuevas raíces que exploran las diferentes áreas pueden ser expuestas a diferentes abundancias relativas de esos propágulos. Además, la viabilidad de los propágulos en el suelo es afectada por un amplio rango de factores bióticos y no bióticos como: las esporas (Lee y Koske, 1994) así como las hifas (Rousseau y col., 1996) pueden ser parasitadas; el laboreo continuado (McGonigle y Miller, 1996), el empleo de barbechos prolongados o rotaciones con plantas no micotróficas (Johnson y col., 1992) y la combinación de

periodos húmedos con labores mecánicas al suelo (Patinson y McGee, 1997) afectan la viabilidad, particularmente de las hifas y las esporas de los hongos micorrízicos.

#### 4.2.3 Poblaciones de las rizobacterias coinoculadas.

***Burkholderia cepacia***. En la Tabla 19 se observa que, en el experimento 1, las poblaciones de *Burkholderia cepacia* en el maíz alcanzaron valores del orden de  $10^6$  ufc.g<sup>-1</sup> de suelo rizosférico, pero las mismas fueron superiores en los tratamientos donde la rizobacteria se inoculó conjuntamente con el hongo MA, con diferencias significativas en relación con los tratamientos donde sólo se aplican dichos hongos al primer cultivo (F1) y al no inoculado (F0), donde sólo alcanzó una población del orden de  $10^4$  ufc.g<sup>-1</sup> de suelo rizosférico. En el boniato, que se plantó como cultivo sucesor, las poblaciones de *B. cepacia*, en los tratamientos inoculados, alcanzaron el orden de  $10^5$  ufc.g<sup>-1</sup> de suelo rizosférico, mientras que donde sólo hubo la colonización micorrízica nativa (F0) apenas alcanzaron  $10^3$  ufc.g<sup>-1</sup> de suelo rizosférico, lo que indica, por un lado, la posible pérdida de las capacidades infectivas de sus células y, por otro, la existencia de una especificidad microorganismo-especies de planta.

**Tabla 19. Variación de las poblaciones rizosféricas de *B. cepacia* en los experimentos 1 y 2.**

Experimento 1								
Frecuencia	Maíz				Boniato			
	Año I		Año II		Año I		Año II	
	ufc	log x						
F0	1,1x10 <sup>4</sup>	4,05 c	1,3x10 <sup>4</sup>	4,05 d	9,3x10 <sup>3</sup>	3,90 c	8,7x10 <sup>3</sup>	3,90 c
F1	3,6x10 <sup>6</sup>	6,55 b	2,1x10 <sup>6</sup>	5,50 c	3,6x10 <sup>5</sup>	5,49 b	4,1x10 <sup>5</sup>	5,48b
F2	7,6x10 <sup>6</sup>	6,88 a	2,0x10 <sup>6</sup>	6,29 b	4,1x10 <sup>5</sup>	5,62 a	3,7x10 <sup>5</sup>	5,52 ab
F3	7,5x10 <sup>6</sup>	6,88 a	2,1x10 <sup>6</sup>	6,86 a	4,3x10 <sup>5</sup>	5,65 a	4,4x10 <sup>5</sup>	5,68 a
ES <sub>x</sub>		0,01**		0,02**		0,03**		0,03**
Experimento 2								
Frecuencia	Girasol				Sorgo			
	ufc	log x						
F0	1,0x10 <sup>4</sup>	3,99 c	1,2x10 <sup>4</sup>	4,02 c	7,0x10 <sup>4</sup>	4,84 c	6,7x10 <sup>4</sup>	4,80 c
F1	3,7x10 <sup>5</sup>	5,56 b	1,8x10 <sup>5</sup>	5,51 b	8,3x10 <sup>5</sup>	5,81 b	1,5x10 <sup>6</sup>	6,18 b
F2	2,3x10 <sup>6</sup>	6,36 a	2,1x10 <sup>6</sup>	6,31 a	3,7x10 <sup>6</sup>	6,54 a	2,2x10 <sup>6</sup>	6,34 a
F3	2,4x10 <sup>6</sup>	6,37 a	2,0x10 <sup>6</sup>	6,33 a	3,6x10 <sup>6</sup>	6,55 a	2,3x10 <sup>6</sup>	6,35 a
ES <sub>x</sub>		0,02**		0,02**		0,01**		0,03**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey para  $p \leq 0,01$

Así, Hernández y col. (1995) encontraron que *B. cepacia* se encuentra muy fuertemente atraída por los exudados radicales del maíz, No obstante, en el boniato, los tratamientos con mayor nivel de colonización micorrízica también alcanzaron las mayores poblaciones de esta rizobacteria. Esta colonización provoca una positiva respuesta del crecimiento de las plantas e influye positivamente en la calidad y cantidad de exudados radicales que estimulan el incremento de la biota bacteriana del suelo. Al respecto, Marschner y col. (1997), señalaron que *B. cepacia* es una bacteria que coloniza diferentes cultivos, pero su acción puede estar influenciada por diferentes factores, tales como la especie de planta, la zona radical y el contacto de la célula con la superficie de la raíz. Por otra parte, en otro estudio, realizado por Soderberg y col. (2002), estos encontraron mayores efectos sobre la comunidad bacteriana en general debidos a la especie de planta que los provocados por los hongos MA.

En el experimento 2, el girasol y el sorgo alcanzaron poblaciones de *B. cepacia* del orden de  $10^6$  ufc.g<sup>-1</sup> de suelo rizosférico, con similar tendencia al aumento de dichas poblaciones con el incremento de la frecuencia de inoculación con hongos MA, y que también se corresponde con los valores más altos encontrados para la colonización micorrízica y la densidad visual. En este sentido es bien conocido que los hongos MA pueden crear mejores condiciones en la rizosfera para el desarrollo de bacterias acompañantes, a través de un mayor intercambio de sustancias y aumento de sitios favorables para el desarrollo bacteriano. En relación con esto, Andrade (2001) señaló que el status de las micorrizas en el suelo puede influir selectivamente en las bacterias inoculadas, mejorando las condiciones del medio donde se desarrollan. Así, Mansfeld-Giese y col. (2002), en un estudio de plantas en asociación con hongos micorrízicos del genero *Glomus* encontró que el género bacteriano *Burkholderia* fue uno de lo más frecuentes, indicando que esas bacterias viven en estrecha relación con los micelios del hongo.

Para el sorgo, durante el primer año se alcanzaron poblaciones superiores cuando se aplicó hongo MA sólo al primer cultivo, mientras que en el segundo año sólo se observaron diferencias con el tratamiento no inoculado (F0). La causa de este comportamiento pudiera ser la poca diferencia en los valores de colonización que alcanzó este cultivo y la gran proporción de raíces de este cultivo sin micorrización.

***Azospirillum brasilense***. En la Figura 6 se muestran las poblaciones de *Azospirillum brasilense* alcanzadas por el maíz, el tomate y la sesbania, apreciándose que los mayores valores fueron alcanzados en el maíz, aunque la tendencia al incremento, a medida que se aumentó la frecuencia de inoculación

del hongo MA, fue similar para todos los cultivos donde se aplicó esta rizobacteria. Las poblaciones de *A. brasilense* encontrada en el tomate fueron superiores en los tratamientos con más alta micorrización, pero más bajos que lo alcanzado por el cultivo del maíz, descartándose una posible influencia adicional por efecto del cultivo anterior. No obstante, Velasco y col. (2002), al inocular *Azospirillum brasilense* en el cultivo del tomate unido a HMA encontraron que los hongos estimularon las poblaciones de esa bacteria, alcanzando poblaciones del orden de  $10^3$  ufc.  $g^{-1}$  en el suelo rizosférico y de  $10^5$  ufc.  $g^{-1}$  de raíces en el rizoplano, afectando positivamente la infección en la endorizosfera.

La población de *A. brasilense* no alcanzó valores superiores a  $10^3$  ufc. $g^{-1}$  cuando se sembró sesbania después del tomate, lo que demuestra la reducción de sus poblaciones una vez eliminados los cultivos anteriormente inoculados, además de la afinidad específica con las especies de plantas cultivadas. En ese sentido, Calderón y col. (2000) encontraron una disminución rápida de la actividad y la dinámica poblacional de los microorganismos beneficiosos después de la realización de labores mecánicas al suelo que, a largo plazo, afectó el contenido de materia orgánica y el “pool” de nutrientes disponibles en el suelo.

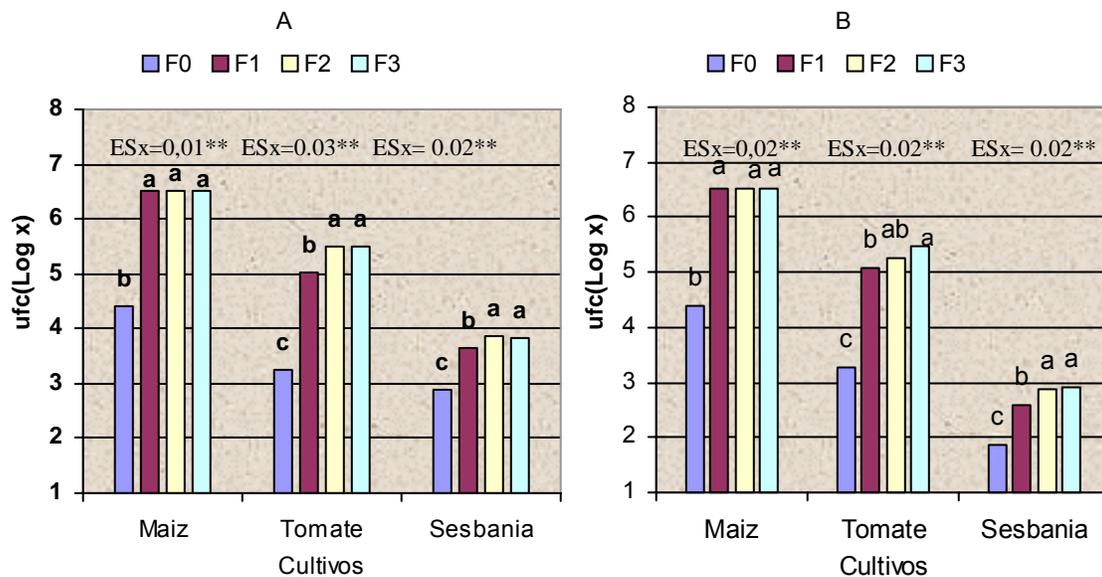


Figura 6 Variación de las poblaciones de *A. brasilense* en el experimento 3. A= año I; B= Año II

En el experimento 4 (Figura 7) el arroz y el boniato alcanzaron poblaciones de *A. brasilense* del orden de  $10^5$  ufc.g<sup>-1</sup> de suelo rizosférico. En el boniato, los valores superiores se alcanzaron en los tratamientos con alta colonización por el hongo MA. El frijol mostró poblaciones bajas al no ser inoculado con *A. brasilense* en ambos años, aunque se encontraron diferencias significativas con las bajas frecuencias de inoculación con HMA.

En ambos experimentos cuando se sembraron leguminosas sin la inoculación de *Azospirillum brasilense*, las poblaciones de esta bacteria fueron muy bajas, posiblemente por la falta de propágulos activo en el suelo, capaces de recolonizar a los cultivos posteriores a niveles significativamente altos, aunque en el caso de sesbania las poblaciones alcanzadas fueron más bajas que en frijol.

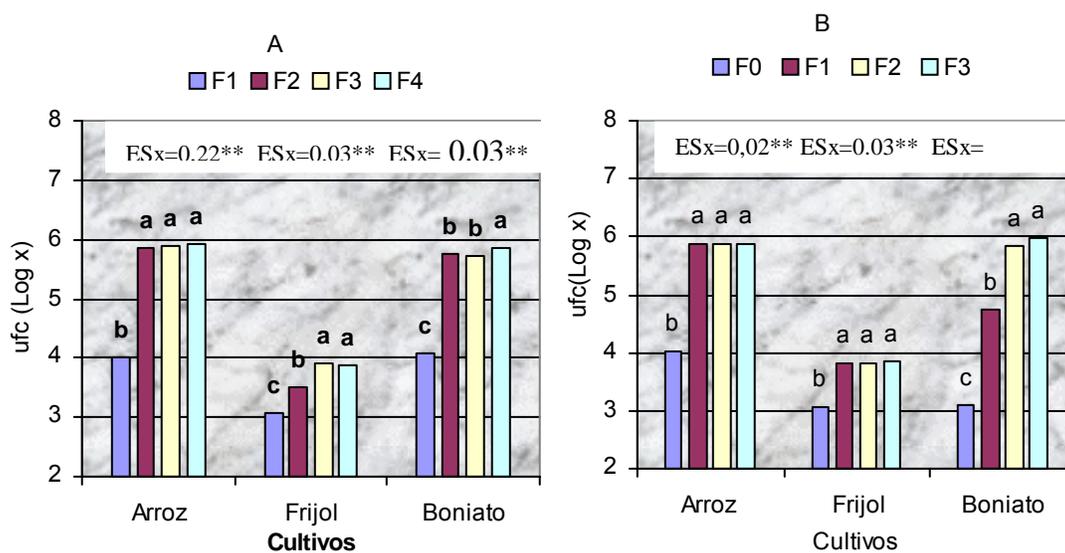


Figura 7 Variación de las poblaciones de *A. brasilense* en el experimento 4. A= Año I; B =Año II

En condiciones tropicales tanto los factores ambientales como los bióticos intensifican sus efectos negativos sobre las poblaciones de rizobacterias cuando se remueven los cultivos o se realizan labores mecánicas que alteran las condiciones del suelo, provocando una disminución de la capacidad de permanencia de estas además de su dilución en toda la masa de suelo. En ese sentido, Bashan (1999) encontró que la remoción de los cultivos reduce intensamente la supervivencia de poblaciones de *A. brasilense* a partir de los 15

días, las que pueden llegar a niveles extremadamente bajos a partir de los 60 días; esto es debido a que el movimiento de este microorganismo depende de los exudados de las raíces en crecimiento, por lo que sus poblaciones alcanzan niveles poblacionales 300 veces más elevadas en la rizosfera que en la masa del suelo, así como poblaciones superiores en los macroagregados que en las partículas más finas del suelo. Al respecto, se debe señalar que en los sistemas de secuencias de cultivos estudiados se realizaron diversas labores mecanizadas que alteraron las condiciones de suelo. Así, los microorganismos edáficos pueden ser agotados como resultado de las diferentes prácticas agrícolas, las cuales reducen el potencial de los inóculos de los organismos beneficiosos (Jeffries y Barea, 2003).

En general, se ha evidenciado que los hongos MA producen una amplia red de micelios en el suelo que constituye un nicho o sitio especializado para el desarrollo de bacterias y que la simbiosis micorrízica interactúa estrechamente con dos grupos bacterianos: las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, asociadas con la superficie del hongo en la rizosfera y un grupo de endobacterias que viven en diferentes fases del ciclo biológico de las micorrizas (Gryndler, 2000). Sin embargo, debemos señalar que las rizobacterias también tienen una marcada influencia sobre el desarrollo de los hongos micorrízicos y los resultados obtenidos demuestran su complementación en los diferentes cultivos estudiados.

Los hongos micorrízicos interactúan con otros microorganismos naturales o introducidos en el suelo a través de la inoculación y afectan de alguna manera la calidad y propiedades del suelo, así como la formación y funcionamiento de los propios hongos MA (Barea y col., 2002). Muchos microorganismos pueden estimular la formación y funcionamiento de los hongos micorrízicos a través de la producción de compuestos que incrementan la permeabilidad de las membranas de las células radicales que facilitan la penetración del hongo e incrementar la cantidad de exudados de las raíces, estimulando a su vez el rápido crecimiento de las hifas (Gryndler, 2000). Por otra parte, los microorganismos afectan el estado de presimbiosis, tal como la germinación de las esporas (Giovanetti, 2000) y el crecimiento del tubo germinativo (Azcon-Aguilar y Barea, 1991). Estos efectos lo realizan a través de la producción de sustancias biológicamente activas, tales como aminoácidos, hormonas, vitaminas y otros compuestos orgánicos y volátiles como el CO<sub>2</sub> que estimulan la formación de los hongos MA.

### **4.3 Efectos en algunos indicadores de las propiedades químicas y físicas del suelo.**

El análisis estadístico factorial de algunos indicadores químicos de la fertilidad del suelo, donde se incluyeron como fuentes de variación los cultivos, las frecuencias de inoculación y los años, sólo detectó diferencias significativas en los factores cultivo y año, lo que permitió representar gráficamente sus dinámicas en el suelo dentro del tiempo estudiado.

#### **4.3.1 Dinámica de la materia orgánica.**

En la Figura 8 aparece representada dicha variación del contenido de materia orgánica para la secuencia de cultivos en cada experimento, pudiendo observarse que en el experimento 1 hubo un incremento progresivo del contenido de materia orgánica hasta el cultivo del boniato, dado por la incorporación de los residuos del maíz y, en los cultivos posteriores, este nivel se mantiene estable. Dicho comportamiento pudo tener sus causas en los volúmenes de residuos aplicados al suelo y a las mezclas de residuos de alta y baja relación C:N que, a través del tiempo, interaccionan positivamente en una combinación de materia orgánica más y menos mineralizada, todo lo cual garantiza un balance adecuado para el incremento inicial y posterior mantenimiento de los niveles de materia orgánica del suelo.

Grant y col. (2002) demostraron que el uso de cultivos intensivos incrementó los residuos que retornan al suelo, los cuales incrementan a su vez los niveles de carbono orgánico. Esto puede conducir a niveles más altos de materia orgánica en el suelo y a elevar el potencial del ciclo de nutrientes para los cultivos. En relación con este aspecto, Burgess y col. (2002) señalaron que los residuos de maíz aportan gran cantidad de N (alrededor de 40-80 kg N.ha<sup>-1</sup> en dependencia del rendimiento y de la concentración de N) y de esa manera contribuyen tanto al "pool" de nitrógeno como a la formación de humus en el suelo.

En el experimento 2, el aumento del contenido de materia orgánica alcanzó un valor máximo después de la incorporación al suelo de los residuos de sorgo, aunque con la incorporación de los residuos del girasol se encontraron diferencias significativas en relación a lo alcanzado en la soya, que en el segundo año desciende ligeramente y finalmente tiende a la estabilidad. Los valores alcanzados en este índice fueron superiores a los logrados en el experimento 1, lo que indica que los cultivos utilizados en el experimento 2 favorecieron en mayor medida la elevación y la estabilidad del contenido de materia orgánica del suelo. Esto se explica por los altos volúmenes de masa seca incorporada al suelo a través de sus residuos y a los altos valores de la relación C:N reportados tanto para el sorgo como para el girasol.

En este sentido, numerosos experimentos y modelos de simulación han demostrado que los residuos de plantas ricas en nitrógeno, como las leguminosas, se descomponen mucho más rápido que aquellos con pobre contenido del elemento (Henriksen y Brelan, 1999; Korsæth y col., 2001). Además, se debe destacar que las altas temperaturas y el laboreo empleado en estos sistemas pudieron acelerar en gran medida la descomposición de estos residuos, con independencia de los componentes lignificados que contienen, así como el hecho de que los residuos que son incorporados en el interior de la masa de suelo se descomponen más rápidamente (Ghidey y Albert, 1993; Schomberg y col., 1994).

En el experimento 3 se encontró que el contenido de materia orgánica aumentó significativamente, en el primer año, después de la incorporación de los residuos de maíz. Sin embargo, con la incorporación de los residuos de sesbania se alcanzaron los valores más elevados de este índice en el suelo, lo cual se explica por el gran volumen de masa seca incorporada. A partir de esa incorporación, los niveles de materia orgánica se mantuvieron con estabilidad en los cultivos posteriores. Burgess y col. (2002) señalaron al respecto que los residuos de cultivos son importantes para el reaprovisionamiento de materia orgánica, el ciclo de los nutrientes, el mantenimiento de las propiedades físicas y en la reducción de la erosión de los suelos.

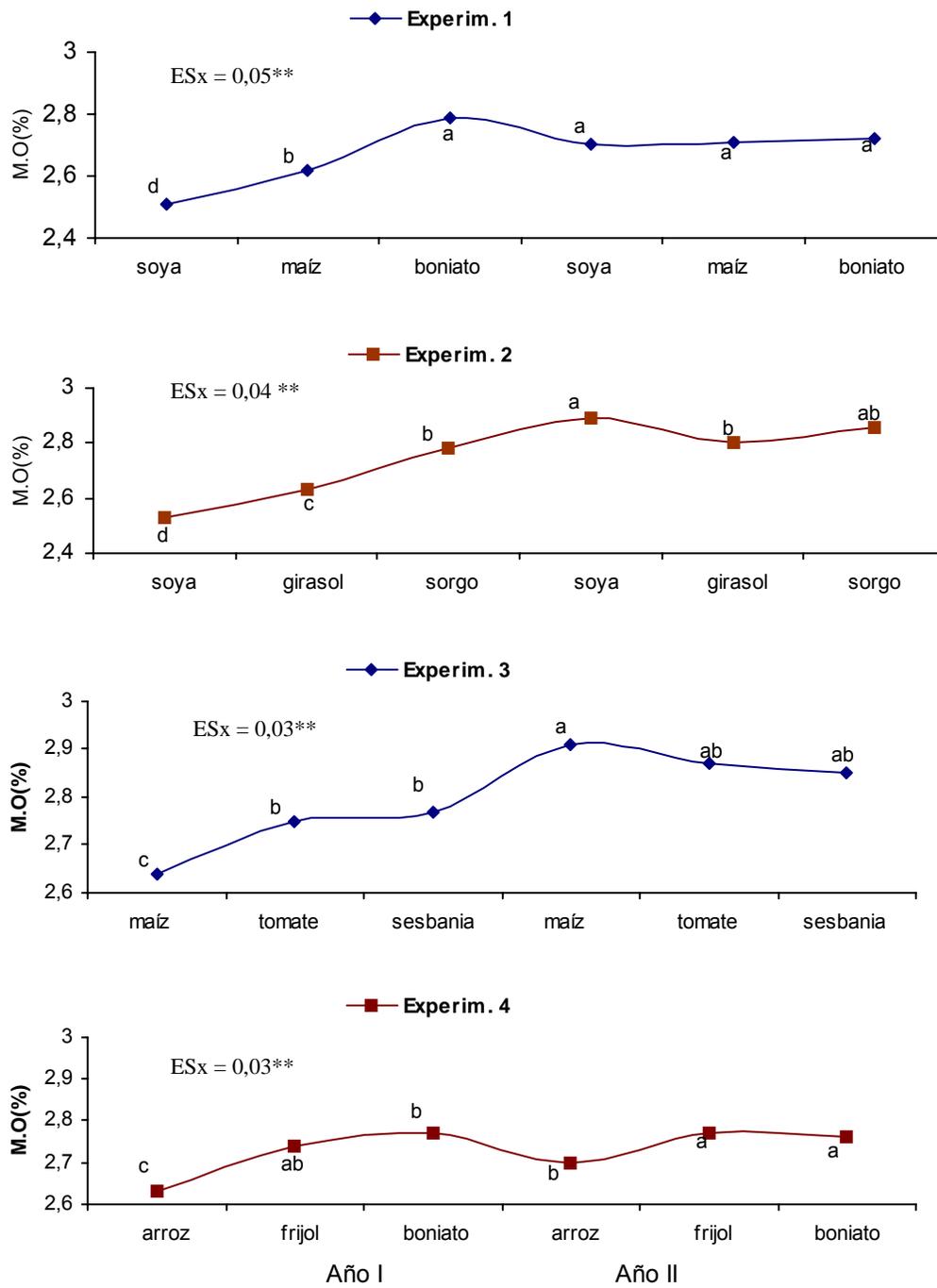


Figura 8. Dinámica del comportamiento de la materia orgánica del suelo en los diferentes experimentos.

En el experimento 4 se alcanzó un ascenso significativo del nivel de materia orgánica después de la incorporación de los residuos de arroz y frijol, pero el mismo descendió en el cultivo posterior a la incorporación de los restos del boniato, logrando estabilizarse en los restantes cultivos. Sin embargo, se debe destacar que los niveles de materia orgánica fueron inferiores a los alcanzados en los experimentos anteriores, lo que puede ser explicado por la incorporación de bajos volúmenes de residuos que contribuyen en menor medida al incremento de la materia orgánica del suelo.

#### **4.3.2 Dinámica del pH.**

En los experimentos 1 y 2 (Figura 9) se aprecian aumentos progresivos del valor de este índice en la misma medida que se incluyen los primeros cultivos en ambos experimentos, estabilizándose a partir de la inclusión del tercer cultivo. Para los experimentos 3 y 4 (Figura 10), se observa un aumento gradual del pH a medida que se incluyeron los diferentes cultivos. Estos resultados pudieran ser explicados por un aumento de la disponibilidad de calcio por efecto de la incorporación de los residuos de los cultivos.

Römheld (1998) señala que el predominio de la absorción aniónica conduce al incremento del pH de la rizosfera tanto en cereales como en dicotiledóneas, mientras Buerkert y col. (2000) encontraron aumentos del pH y mayor disponibilidad de nutrientes con la incorporación de residuos de cultivos. Estos aumentos del pH pudieran atribuirse también a la movilización y acumulación de elementos que se mueven por flujo de masa (Ca y Mg) hacia las raíces de cultivos, en cantidades que exceden las necesidades de absorción de las plantas (Marschner, 1998).

En general, los cambios en el pH tienen una marcada influencia en la fase sólida del suelo, ya que determinan la carga en las superficies de los hidróxidos de Fe y Al, que son la principal causa de la adsorción de fósforo en estas condiciones. Un incremento en el pH reduce las cargas positivas de los hidróxidos y moviliza las formas aniónicas del fósforo así como el P unido al carbono orgánico.

#### **4.3.3 Dinámica del potasio cambiante.**

De manera general, el contenido de potasio cambiante mostró una tendencia al incremento aunque con particularidades entre cultivos y secuencias. De acuerdo a la Figura 9, en el experimento 1, durante el primer año se encontraron los mayores valores después del cultivo del maíz, mientras que en el

segundo año, aunque hubo un descenso en los valores, no se encontraron diferencias entre los cultivos. Además, siempre que se cultivó boniato los valores del contenido final del nutriente en el suelo fueron inferiores. En el experimento 2, los valores más altos de potasio cambiante se alcanzaron después de la incorporación de sorgo y, posteriormente, estos se mantuvieron con tendencia a la estabilidad en los demás cultivos.

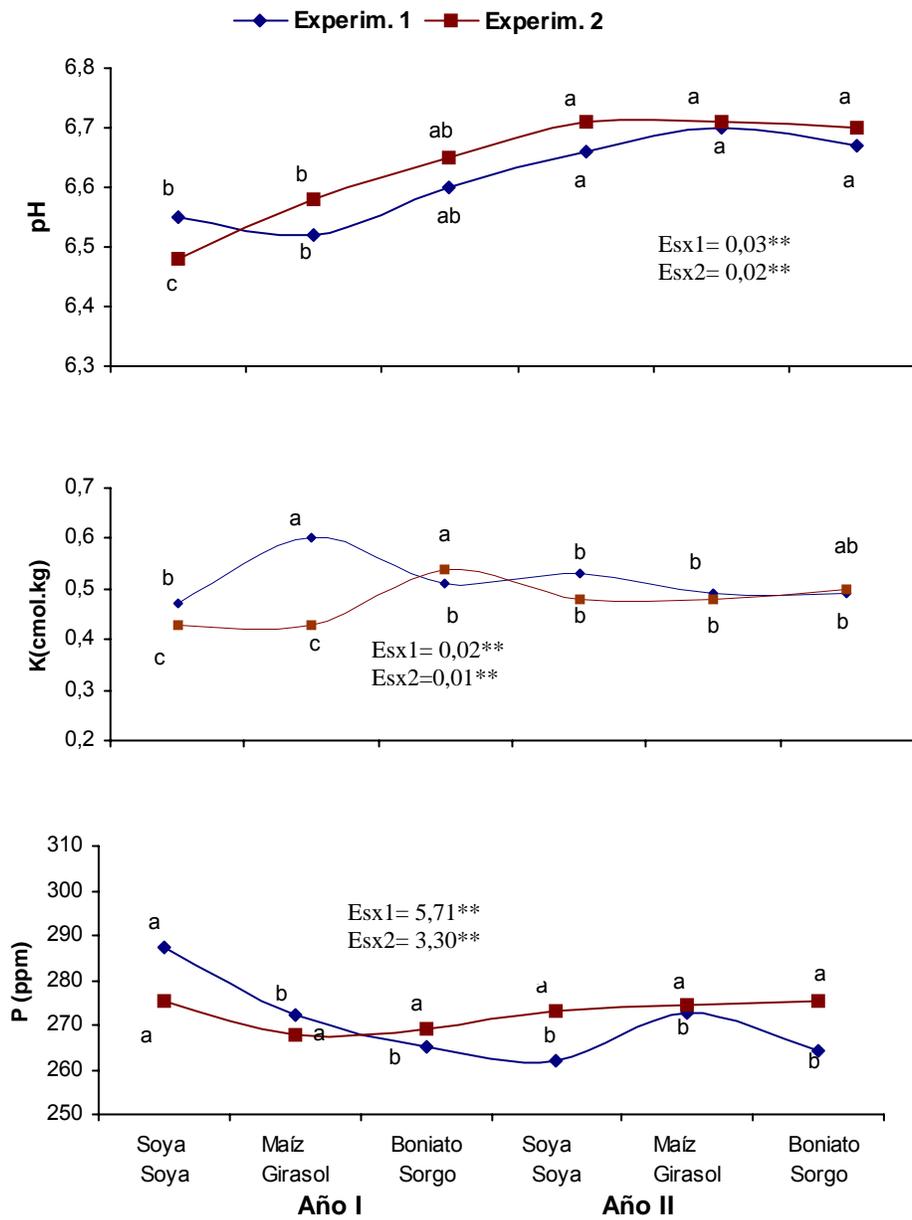


Figura 9. Comportamiento del pH, el K intercambiable y P asimilable del suelo en los 2 años de estudio en los experimentos 1 y 2

En los experimentos 3 y 4 (Figura 10), se encontraron también aumentos en la disponibilidad de potasio cambiante, con un máximo después de la incorporación de sesbania en el experimento 3, a partir del cual esta se mantiene sin diferencias significativas; mientras, en el experimento 4 se logró un incremento del nutriente después de la incorporación de los residuos del arroz y luego estos se mantienen con cierta estabilidad. Shepherd y Harrison (2000) encontraron que los abonos verdes no incrementaron el contenido total de potasio en el suelo, pero tuvieron una marcada influencia en su distribución y disponibilidad. Por otra parte, varios estudios han demostrado que el material vegetal de plantas ricas en N se descompone más rápido que los residuos con alta relación C:N (Henriksen and Breland, 1999; Korsæth y col., 2001).

En zonas tropicales y subtropicales, el escenario edáfico cambia totalmente. Las intensas precipitaciones y la presencia de suelos muy meteorizados determinan que gran parte del potasio disponible en la solución del suelo sea lavado fuera de la zona de aprovechamiento radical.

#### **4.3.4 Dinámica del fósforo asimilable.**

Al observar la Figura 9 se puede apreciar que el contenido de fósforo asimilable en el experimento 1 mostró valores significativamente inferiores después del segundo cultivo, pero se mantuvo estable, posteriormente, durante el transcurso del experimento. En el experimento 2, no se observaron cambios significativos en el contenido del elemento con la inclusión de los diferentes cultivos, lo cual puede ser explicado por los altos contenidos iniciales del elemento en el suelo (Tabla 1) cuyos remanentes después de cada cultivo no se pierden fácilmente, sino que quedan en el mismo generando efectos residuales para los cultivos posteriores.

Esta es una característica muy importante del fósforo, ya que permite desarrollar esquemas de aplicación con un uso mínimo de fertilizantes, o bien no fertilizar aprovechando el efecto residual (Grant y col., 2001). La fracción de fósforo asociada a la materia orgánica constituye, en la mayoría de los suelos, entre 30 y 50 % del fósforo total y, además, la mayor parte de los compuestos que forma el fósforo son de baja solubilidad, por lo que las concentraciones en la solución del suelo son bajas en general. Como las formas orgánicas normalmente no son asimiladas directamente por las plantas, deben ser mineralizadas previamente por fosfatasa extracelulares y, de esa manera, la cantidad de P disponible es continuamente reemplazada a través de la mineralización del fósforo orgánico y las reacciones de desorción, lo que

determina que el “pool” de fósforo asimilable sea fuertemente dependiente del tiempo (Fardeau, 1999).

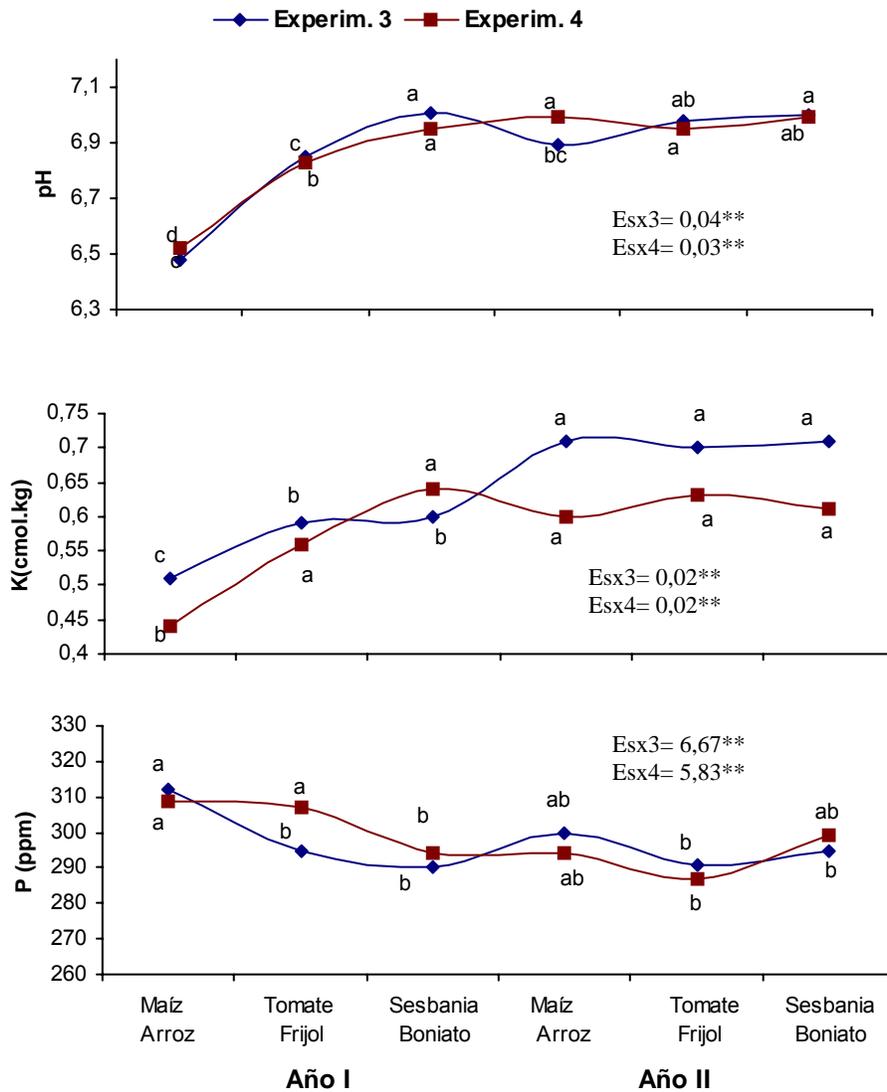


Figura 10. Comportamiento del pH, el K intercambiable y el P asimilable del suelo en los 2 años de estudio en los experimentos 3 y 4

En los experimentos 3 y 4 (Figura 10) se encontraron algunas fluctuaciones del contenido de fósforo asimilable, pero con tendencia general a no declinar en ese periodo de tiempo. Esto pudiera ser producto del balance diferente que se establece entre los cultivos y las diferentes cantidades de residuos que aportan. Por otra parte, los ácidos orgánicos, derivados de la descomposición de la materia orgánica, compiten con el fósforo por los sitios de sorción cuando están en forma aniónica, mejorando también la movilización del nutriente. Flores (1997) señala que, al descomponerse la materia orgánica, libera citrato, oxalato, tartrato y lactato, los cuales se combinan más fácilmente con Fe y Al que con fósforo, lo que incrementa la disponibilidad de este elemento. Por otra parte, Shepherd y Harrison (2000) encontraron que los abonos verdes influyeron en la distribución y disponibilidad de este nutriente y al mismo tiempo la disponibilidad del fósforo nativo se incrementa cuando mejoran los niveles de materia orgánica del suelo.

#### **4.3.5 Indicadores del estado de agregación del suelo.**

La evaluación del posible efecto de los factores secuencias de cultivos y frecuencia de inoculación sobre algunas propiedades físicas relacionadas con el estado de agregación de las partículas del suelo, mediante un análisis bifactorial, arrojó la existencia de diferencias significativas en su interacción, lo que permitió la comparación entre todas las variantes estudiadas. Se presentan sólo los resultados para el 1er año de estudio, ya que el comportamiento de los diferentes índices evaluados fue similar durante los dos años, incluyéndose en el Anexo 1 (Tablas A-1 y A-2) los datos correspondientes a ambos años de estudio.

En la Figura 11 se observa que los agregados de 2-5 mm tamizados en seco (ts) aumentaron con el incremento de las frecuencias de inoculación, aunque no existieron diferencias significativas entre las mayores frecuencias (F2 y F3). Al respecto, Miller y Jastrow (2000) encontraron que las hifas de los hongos micorrízicos son capaces de enredar las partículas del suelo y formar agregados de tamaño superior.

Los valores alcanzados en los agregados de ese tamaño fueron superiores en la secuencia soya-girasol-sorgo, lo que indica que las especies incluidas en dicha secuencia influyeron marcadamente en la formación de esos agregados, posiblemente por el profuso sistema radical de sorgo y el girasol y el aumento que producen en el contenido de materia orgánica del suelo (Fig. 8). En este sentido, Wrigth y col. (2001) señalan que la agregación es un proceso complejo, donde interaccionan sustancias cementantes producidas por hongos, bacterias y plantas, mientras que Alvarenga y col. (1986) concluyeron que los residuos de los cultivos

favorecieron el desarrollo de agregados mayores de 2 mm. Por otra parte, Correa (2002) encontró aumentos en el porcentaje de agregados mayores de 2,0 mm cuando se incrementó el contenido de materia orgánica del suelo.

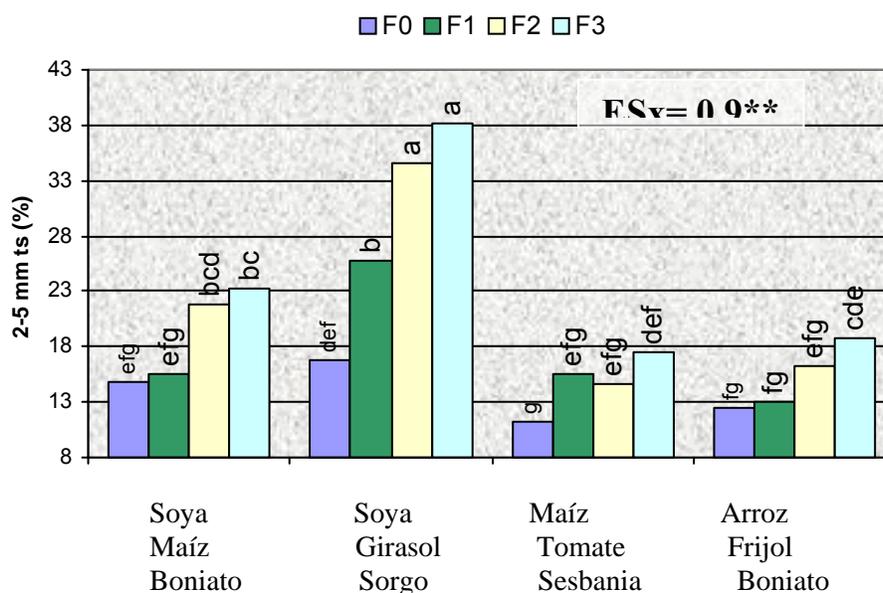


Figura 11. Comportamiento de la proporción de agregados de 2 - 5 mm (tamizados en seco) en las diferentes secuencias de cultivos.

En la Figura 12, al analizar la proporción de agregados de 1- 0,25 mm tamizados en húmedo (th), tampoco se encontraron diferencias entre las frecuencias F2 y F3, las cuales alcanzaron los valores más altos en la proporción de agregados estables en agua en todas las secuencias. Estos resultados evidencian la influencia de los hongos MA para lograr mayor proporción de agregados estables en el suelo y pueden estar relacionados también con la presencia de algunas sustancias orgánicas como polisacáridos exudadas por plantas y bacterias.

Aunque Wrigth y col. (1999) señalaron que el impacto de los sistemas de cultivo sobre la producción de una sustancia específica que contribuya a la estabilidad de los agregados no está bien dilucidada, los resultados obtenidos pudieran estar relacionados con la glomalina exudada por los hongos MA, una glicoproteína que es depositada en la parte exterior de las hifas y sobre las partículas adyacentes, actuando como una goma hidrofóbica estable que reduce

la ruptura de los agregados durante los eventos de alternancia de humedad y sequía en el suelo, al retardar el movimiento del agua en los poros de la estructura de los agregados, influyendo positivamente en su estabilidad. Así, Almendras (2000) observó deposiciones de glomalina sobre las superficies de los agregados más estables.

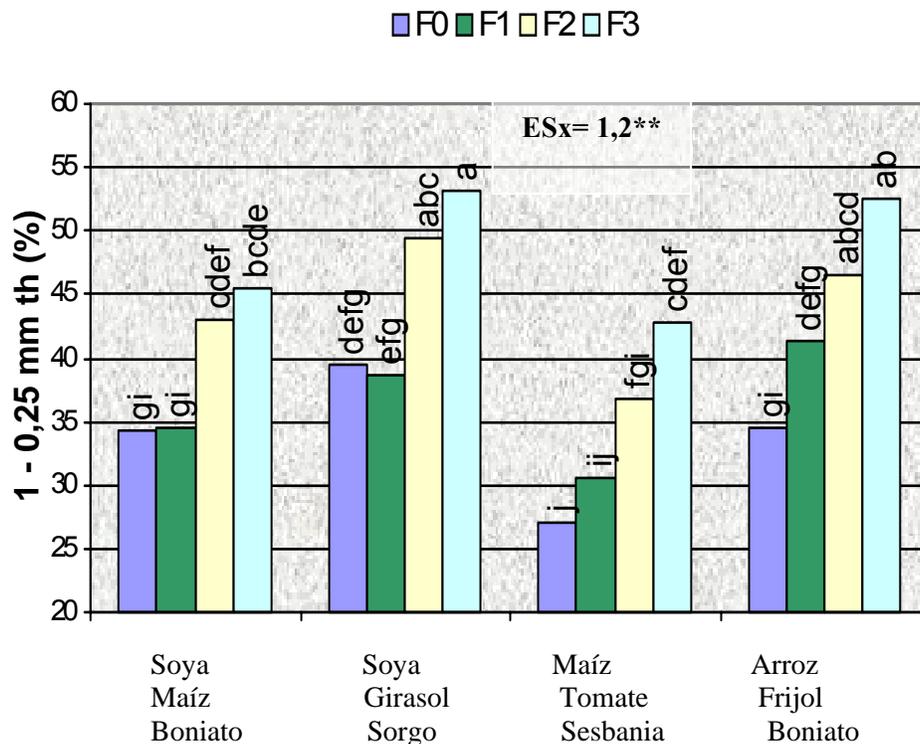


Figura 12. Comportamiento de la proporción de agregados de 1 - 0,25 mm (tamizados en humedo) en las diferentes secuencias de cultivos.

Por su parte, el coeficiente de dispersión  $-K_d-$  (Figura 13) disminuyó en los tratamientos donde se inocularon, al menos, los dos primeros cultivos de cada secuencia (F2 y F3), comportamiento que tiene relación directa con la disminución de los contenidos de arcilla en la microestructura, ya que la textura en los suelos prácticamente no cambia en cortos periodos de tiempo. Esto demuestra que, por una parte, la acción de los microorganismos comienza desde el agrupamiento de las partículas más pequeñas y, por otra que, con el empleo de hongos MA, el suelo se degrada con menor intensidad, ya que ofrece mayor resistencia a los

procesos erosivos. Correa (2002) encontró que, en cultivos intensivos, aumentan las alteraciones mecánicas en el suelo, lo que provoca el aumento de la dispersión de las arcillas y la proporción de agregados de menor tamaño

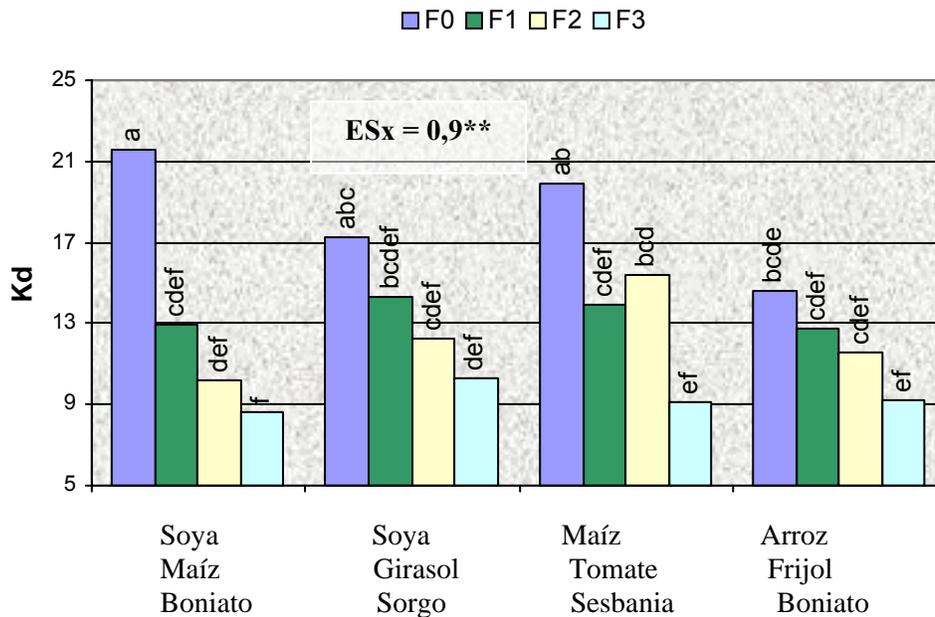


Figura 13. Comportamiento del coeficiente de dispersión (Kd) en las diferentes secuencias de cultivos.

También el índice de estabilidad  $-le-$  (Figura 14) fue superior en los tratamientos donde, al menos, se inocularon dos cultivos de cada secuencia, resultados que sugieren que el establecimiento de plantas inoculadas con hongos MA influye positivamente en los procesos de estabilidad de los agregados, posiblemente por la producción de exudados de sustancias que ayudan al proceso como puede ser el caso de la glomalina, ya señalado anteriormente. Por otra parte, no se encontraron diferencias entre las secuencias de cultivos, lo que induce a pensar que la mayor influencia sobre este índice la ejercieron los microorganismos inoculados. Al respecto, Campos y col. (1995) encontraron mayor proporción de agregados estables en sistemas de siembra directa, mientras que Bearden y Petersen (1999) hallaron una marcada contribución de los hongos MA a la estabilidad de los agregados del suelo, donde el efecto ya fue significativo después de una sola estación de crecimiento. Dichos efectos fueron asociados con la acción de las hifas en la unión de las partículas, en primer término, y su posterior estabilidad una vez formados los agregados.

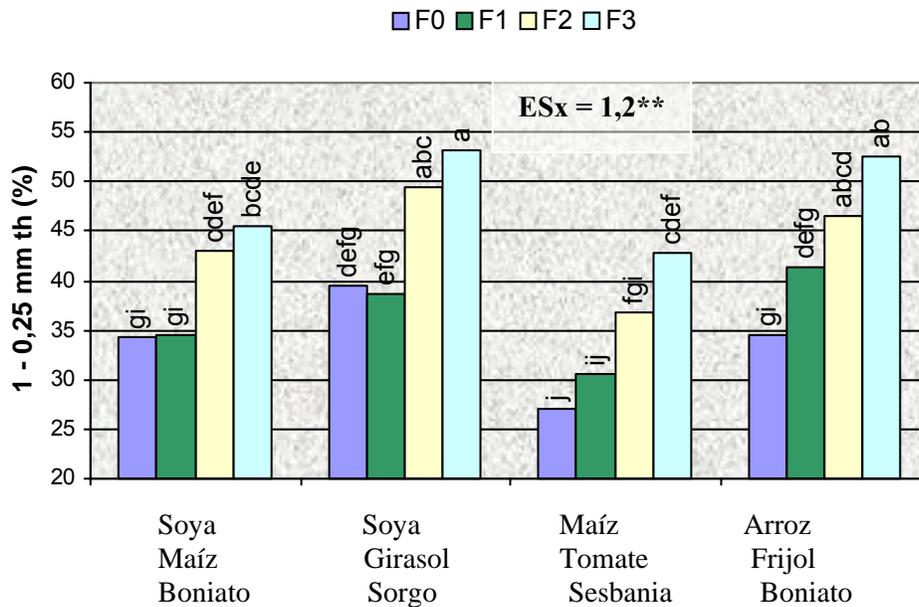


Figura 14. Comportamiento del índice de estabilidad (Ie) en las diferentes secuencias de cultivos.

Para comprobar la existencia de relaciones funcionales entre los índices de agregación de las partículas del suelo y las variables micorrízicas, se realizaron análisis de correlación lineal para los resultados de ambos años de estudios. En la Tabla 20 se pueden observar correlaciones fuertes y positivas entre las proporciones de agregados de 2 - 5 mm (ts) y 1 - 0,25 mm (th), indicando que, a medida que aumentó la formación de agregados, aumentó también su estabilidad, lo que queda confirmado al mostrar los agregados estables al agua correlaciones altas pero negativas con los agregados menores de 0,25 mm (th) con resultados similares para el coeficiente de dispersión (Kd).

Por otra parte, tanto la colonización micorrízica como la densidad visual correlacionaron positiva y significativamente con la proporción de agregados entre 0,25 - 1 mm (th) estables al agua y el índice de estabilidad, lo que confirma la influencia de los hongos MA en los procesos de estabilidad de las partículas del suelo. Resultados similares encontraron Wright y col. (1999) y Almendras (2000) con coeficientes de correlación significativos entre la estabilidad de los agregados y la colonización micorrízica, así como entre la estabilidad de los agregados y la producción de glomalina exudada por dichos hongos. También Rillig y col. (1999) encontraron relaciones similares en suelos cultivados de pastos y expuestos a

altos niveles carbono atmosférico, mientras que Wright y Anderson (2000) encontraron que, en secuencias de cultivos que incluyeron trigo, maíz y girasol, los niveles de glomalina fueron superiores a los hallados en secuencias que incluyeron barbechos.

**Tabla 20. Relaciones entre los índices de agregación del suelo y las variables micorrízicas**

	Años	Coloniz. (%)	D. visual (%)	Agregados < 2 mm	Agregados 2 - 5 mm	Agregados 0,25 - 1mm	Agregados < 0,25 mm	Kd
D. visual	Año I Año II	0,91*** 0,96***						
Agregados < 2 mm	Año I Año II	-0,21 -0,15	0,05 0,11					
Agregados 2-5 mm	Año I Año II	0,33 0,34	0,25 0,29	-0,57* -0,75***				
Agregados 0,25-1mm	Año I Año II	0,78*** 0,80***	0,64** 0,75***	-0,42 -0,32	0,69**, 0,63**			
Agregados < 0,25	Año I Año II	-0,70** -0,77***	-0,56* -0,67**	-0,02 -0,03	-0,45 -0,29	-0,79*** -0,81***		
Kd	Año I Año II	-0,81*** -0,83***	-0,75*** -0,79***	0,28 0,25	-0,43 -0,51*	-0,71** -0,83***	0,58* 0,68**	
Ie	Año I Año II	0,69** 0,71**	0,68** 0,69**	-0,40 -0,31	0,47 0,34	0,60** 0,68**	-0,37 -0,69**	-0,74** -0,54*

Las correlaciones altas y negativas encontradas entre la colonización micorrízica y los agregados menores de 0,25 mm y el coeficiente de dispersión, indican que los suelos donde los cultivos logren una asociación eficiente con los microorganismos inoculados serán menos afectados por los procesos erosivos, lo que contribuirá a mantener y/o mejorar las características productivas de los mismos, ya que no hay proceso que ocurra en el suelo que sea independiente de la estructura, ya que esta garantiza el movimiento del agua y del aire y, por tanto, la actividad de todos los organismos que se desarrollan en su seno.

Las bajas correlaciones encontradas entre las variables micorrízicas y la proporción de agregados 2-5 mm indican la influencia de otros factores en la formación de los agregados de mayor tamaño, donde el sistema radical de las

especies de cultivos y la cantidad de residuos orgánicos incorporados por ellos pudieran tener una mayor influencia.

#### 4.4 Efectos en la extracción de nutrientes.

##### 4.4.1 Extracciones de nitrógeno.

Las extracciones de nitrógeno realizadas por la soya (Tabla 21) demuestran que con la inoculación de *Bradyrhizobium japonicum* unido al hongo MA y sólo 30 kg N. ha<sup>-1</sup>, el cultivo alcanzó extracciones del nutriente similares a las logradas con la aplicación de 180 kg N. ha<sup>-1</sup>, lo que demuestra la eficiencia de la combinación de estos organismos en la absorción y asimilación del nitrógeno por dichas plantas. Similares resultados fueron alcanzados por Corbera (1998) en condiciones edafoclimáticas similares; asimismo, Hernández y Guzmán (2002) encontraron, para el mismo cultivo, que en los tratamientos donde se aplicó la combinación de HMA y *B. japonicum* se alcanzaron rendimientos similares a aquellos donde se utilizaron normas completas de fertilización nitrogenada.

**Tabla 21. Extracción de nitrógeno (kg N.ha<sup>-1</sup>) por los cultivos en los experimentos 1 y 2.**

	Soya		Maíz		Boniato	
Frecuencia	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	145,7	144,7	116,0 a	125,6 a	78,6 a	81,2 a
F1	140,8	138,5	102,3 b	111,8 b	69,8 b	74,3 b
F2	143,2	143,9	119,2 a	122,0 a	75,5 ab	84,0 a
F3	143,8	148,5	117,2 a	121,6 a	77,1 a	81,2 a
ES <sub>x</sub>	5,1 <sup>ns</sup>	4,4 <sup>ns</sup>	3,0**	3,4**	1,5**	1,5**
Frecuencia	Soya		Girasol		Sorgo	
F0	147,1	146,0	125,5 a	127,0 a	89,1 a	99,2 a
F1	142,9	141,7	115,5 b	116,7 b	77,5 b	83,2 b
F2	138,7	141,0	123,7 a	127,0 a	89,7 a	95,3 a
F3	142,0	145,4	124,4 a	128,0 a	88,9 a	99,3 a
ES <sub>x</sub>	4,3 <sup>ns</sup>	3,2 <sup>ns</sup>	0,9**	1,6**	1,7**	1,4**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey para  $p \leq 0,01$

En los cultivos de maíz, boniato, girasol y sorgo se alcanzaron los mayores valores de absorción de N, similares a los del testigo fertilizado y no inoculado (F0), en las variantes donde *Burkholderia cepacia* fue aplicada junto con el hongo MA en, al menos, dos cultivos (F2 y F3); sin embargo, se alcanzaron valores

significativamente inferiores cuando se coinoculó sólo el primer cultivo (F1), tratamiento que a su vez, como ya fue analizado anteriormente, alcanzó los menores valores de las variables micorrízicas y las poblaciones de rizobacterias, lo que evidencia que en los tratamientos donde se inocularon por lo menos dos cultivos garantizaron la existencia de condiciones favorables para el mejor desarrollo de las plantas, a partir de las diferentes sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal que aporta *B. cepacia* y de los beneficios del hongo micorrízico, que absorbe nitrógeno a través de sus hifas y propicia una mejor utilización del nutriente por las plantas.

En ese sentido, Ortiz (2001) señaló que *B. cepacia* tiene gran importancia para los cultivos debido, fundamentalmente, a la producción de una amplia gama de metabolitos que influyen positivamente sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Complementariamente, Minerdi y col. (2003) señalaron la existencia de bacterias del género *Burkholderia* que viven asociadas a todas las fases del ciclo de vida de los hongos MA y presentan genes apropiados para metabolizar el nitrógeno. También Hernández y col. (1998) demostraron que la inoculación del maíz con *B. cepacia* provoca incrementos en la masa fresca de las plantas y mejora su estado nutricional en general.

Se debe señalar que, en ambos experimentos, la nutrición nitrogenada de los cultivos fue beneficiada adicionalmente por la incorporación de los residuos de la soya, los cuales quedan a disposición de los cultivos posteriores a través del N<sub>2</sub> fijado e incorporado al suelo. Así, Barber (1994) plantea que el maíz y el sorgo, en rotación con soya, requieren de menos fertilizante nitrogenado para obtener rendimientos máximos. Mientras, Azcon y col. (2001) encontraron alta contribución de los hongos micorrízicos a la absorción de nitrógeno cuando se aplicaban dosis bajas de fertilizantes, y Hawkins y George (1999) demostraron que las hifas de los hongos MA contribuyen a la adquisición de nitrógeno mineral y aumentan la actividad de la nitrogenasa en plantas leguminosas micorrizadas. Por otra parte, Valentine y col. (2002) concluyeron que cuando se fertiliza con NH<sub>4</sub> se puede causar un antagonismo entre el nitrógeno y el metabolismo del fósforo, donde los HMA actúan en la moderación de este efecto.

La Tabla 22, correspondiente a las extracciones de N en los experimentos 3 y 4, muestra que en el maíz y el arroz todos los tratamientos inoculados alcanzaron valores similares al testigo en los dos años. Como en dichos tratamientos sólo se aportó el 60 % del nitrógeno necesario, estos resultados son indicativos de que se logró un suministro complementario del nutriente con la coinoculación. En el maíz, durante el segundo año, las extracciones fueron superiores debido a la incorporación previa de la sesbania como abono verde.

Para el tomate, en la variante donde solo se aplicó HMA en el primer cultivo (F1) la absorción de nitrógeno fue significativamente inferior al resto de los tratamientos, lo que puede ser explicado por un efecto de dilución de los propágulos micorrízicos en el suelo, después del trasplante que se realiza, provocando que ellos logren colonizar las plantas en etapas mas tardías y disminuyan los efectos positivos de esos hongos en la nutrición.

Las mayores extracciones del elemento en los tratamientos donde se aplicaron hongos micorrízicos combinados con *Azospirillum brasilense* en al menos dos cultivos, permite corroborar el aumento de la eficiencia del uso del nitrógeno cuando se combinan los dos inóculos, al igual que ocurrió con la rizobacteria *Burkholderia cepacia* en los experimentos 1 y 2, al garantizar mayor actividad enzimática, como encontraron Reynaldo y col. (2000) en plantas de tomate inoculadas con hongos micorrízicos. Además, Azcon y col. (2001) encontraron alta contribución de los hongos MA a la absorción de nitrógeno cuando se aplicaron dosis bajas de fertilizantes.

**Tabla 22. Extracción de nitrógeno (kg N.ha<sup>-1</sup>) por los cultivos en los experimentos 3 y 4.**

Frecuencia	Maíz		Tomate		Sesbania	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	113,9	126,7	147,5 a	148,6 a	162,8 b	155,4 b
F1	110,6	124,9	122,3 b	120,1 b	175,3 b	158,9 b
F2	113,1	123,6	144,1 a	140,9 a	206,0 a	196,5 a
F3	111,1	125,0	145,6 a	142,8 a	214,8 a	210,1 a
ES <sub>x</sub>	1,3	2,1	5,7**	3,9**	5,0**	6,3**
Frecuencia	Arroz		Frijol		Boniato	
F0	100,0	99,6	103,2 a	97,9 a	83,8 a	85,4 a
F1	98,1	89,4	82,8 b	76,4 b	71,0 b	70,7 b
F2	99,0	91,6	101,6 a	92,1 a	85,1 a	80,3 a
F3	96,2	97,8	102,2 a	100,5 a	85,4 a	81,7a
ES <sub>x</sub>	2,2	3,0	2,2**	2,6**	1,5**	1,6**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey para  $p \leq 0,01$

Similar comportamiento mostró el frijol, ya que sólo se detectaron diferencias significativas con el testigo fertilizado en el tratamiento donde únicamente se aplicó HMA (F1), indicando los efectos positivos de la coinoculación micorrízica-bacteriana en la nutrición nitrogenada. En este mismo cultivo Hawkins y George (1999) demostraron que las hifas del hongo contribuyeron a la adquisición de nitrógeno mineral y la actividad nitrogenasa fue superior en las plantas micorrizadas.

En relación a los terceros cultivos de cada secuencia, la sesbania tuvo un comportamiento diferente al del boniato, alcanzando los valores superiores de extracción en los tratamientos donde se inocularon dos o tres cultivos de las secuencias (F2 y F3), resultado producto del post-efecto micorrízico, mientras el boniato mostró un comportamiento similar al tomate y el frijol.

#### 4.4.2 Extracciones de fósforo

Las Tablas 23 y 24 muestran el comportamiento de las extracciones de fósforo por los cultivos en los experimentos 1 y 2 y 3 y 4, respectivamente. Para los primeros cultivos de cada secuencia, soya (1 y 2), maíz (3) y arroz (4), se obtuvieron aumentos significativos de la extracción del nutriente en los tratamientos inoculados con hongos micorrízicos (F1, F2 y F3) en comparación con el testigo no inoculado (F0), comportamiento explicable por los altos niveles de colonización micorrízica alcanzados por esos cultivos y que propician que las plantas realicen altas extracciones de este elemento.

**Tabla 23. Extracciones de fósforo (kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.ha<sup>-1</sup>) por los cultivos en los experimentos 1 y 2.**

Frecuencia	Soya		Maíz		Boniato	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	18,3 b	19,5 b	21,0 b	26,9 b	18,2 b	17,4 b
F1	19,9 a	23,1 a	23,7 ab	26,8 b	19,6 b	17,6 b
F2	20,8 a	22,8 a	27,0 a	28,8 a	21,8 a	20,4 a
F3	20,7 a	22,8 a	26,2 a	29,5 a	22,9 a	21,8 a
ES <sub>x</sub>	0,5**	0,5**	0,9**	0,5**	0,6**	0,3**
Frecuencia	Soya		Girasol		Sorgo	
F0	19,0 b	20,3 b	26,8 b	27,6 b	26,1 b	28,5 b
F1	23,9 a	22,2 a	27,5 b	28,1 b	27,3 ab	29,2 b
F2	21,9 a	23,4 a	31,4 ab	31,3 a	31,9 a	34,2 a
F3	22,6 a	24,3 a	33,3 a	33,7 a	32,5 a	35,5 a
ES <sub>x</sub>	0,5**	0,4**	1,1**	0,5**	0,6**	0,8**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey para  $p \leq 0,01$

**Tabla 24. Extracciones de fósforo (kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.ha<sup>-1</sup>) por los cultivos en los experimentos 3 y 4.**

Frecuencia	Maíz		Tomate		Sesbania	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	21,9 b	23,2 b	16,0 b	17,1 b	29,1 c	28,3 b
F1	26,2 a	26,9 a	17,2 b	18,3 ab	32,2 b	30,4 b
F2	27,3 a	27,7 a	19,5 a	19,8 ab	36,2 a	39,5 a
F3	26,2 a	28,1 a	19,2 a	21,1 a	38,3 a	41,7 a
ES <sub>x</sub>	0,7**	0,5**	0,4**	0,6**	0,8**	2,7**
Frecuencia	Arroz		Frijol		Boniato	
F0	16,1 b	15,2 b	7,5 b	8,2 c	16,7 b	16,9 b
F1	19,5 a	18,2 a	8,2 b	9,6 bc	16,4 b	16,8 b
F2	20,1 a	19,0 a	10,0 a	11,2 ab	19,5 a	19,3 ab
F3	19,0 a	19,7 a	11,1 a	12,4 a	19,4 a	21,7 a
ES <sub>x</sub>	0,6**	0,5**	0,3**	0,3**	0,2**	0,3**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey para  $p \leq 0,01$

En los restantes cultivos, por lo general, se encontró que la absorción del fósforo era significativamente superior a medida que se aumentaba la frecuencia de inoculación para al menos los dos primeros cultivos, ya que la utilización de la frecuencia F2 fue suficiente para alcanzar valores similares a F3, demostrándose la efectividad del post-efecto micorrízico en la absorción de este elemento.

Los cultivos que alcanzan altos valores de colonización micorrízica logran absorber cantidades más elevadas de fósforo ya que sus finas hifas tienen acceso a formas del nutriente no disponibles para plantas no micorrizadas. Estas hifas son capaces de absorber el fósforo por debajo de los niveles críticos establecidos para los cultivos. Además, sirven de puente entre las zonas de agotamiento del nutriente en el suelo, creadas por la absorción del elemento y las zonas que presentan adecuada disponibilidad y que están alejada de la raíz.

Rattan y col. (2001) encontraron estrecha relación entre la absorción de fósforo y la colonización micorrízica en diferentes cultivos, mientras Miller y col. (1995) demostraron que la remoción del suelo por labores de cultivo reduce la efectividad de la simbiosis micorrízica, lo que, en los sistemas con menos intensidad de labranza, conduce a una colonización más temprana y la extracción de fósforo fue superior en los primeros estadios de crecimiento del cultivo. El desmenuzamiento de la macroestructura del suelo rompe la integridad de la red hifal y la efectividad de los propágulos para colonizar es más baja que en las estructuras intactas. Por otra parte, se inhibe la habilidad del sistema de raíces del

cultivo previo para suplir energía y nutrientes a las hifas aptas para colonizar. También las excreciones de asimilatos desde las raíces vivas son mayores en suelos con mínimo laboreo, lo que provoca diferencias en la colonización. Así, Miller (1993) sustenta la hipótesis de que la ruptura de los micelios extraradicales es la principal causa de la reducida absorción de fósforo en suelos alterados, independientemente del efecto sobre la colonización micorrízica.

#### **4.4.3 Extracciones de potasio**

La extracción de potasio por los cultivos de los cuatro experimentos (Tablas 25 y 26) mostró, en sentido general, un patrón de comportamiento semejante al ya discutido para las extracciones de N y P, observándose que los tratamientos F2 y F3, con las mayores frecuencias de inoculación, alcanzan los valores superiores, siendo los efectos de las frecuencias más marcados en los cultivos de alta demanda de potasio. Koide (2000) señala que diferentes especies de plantas pueden variar sus respuestas a la colonización micorrízica y pueden ocurrir variaciones temporales en dependencia de las demandas de nutrientes.

Los hongos micorrízicos influyen positivamente en la absorción de cationes como el potasio, sobre todo en aquellos cultivos con altas demandas del nutriente, ya que se crea una zona de agotamiento del mismo alrededor de las raíces y los HMA pueden compensar este efecto trasladando el elemento a través de su red micelial desde zonas del suelo con mayores contenidos pero más alejadas del sistema radical. Resultados similares fueron encontrados por Liu y col. (2002) en el maíz, relacionando los valores más altos de extracción de potasio con los más altos valores de colonización micorrízica del cultivo.

**Tabla 25. Extracciones de potasio (kg K<sub>2</sub>O.ha<sup>-1</sup>) por los cultivos en los experimentos 1 y 2.**

Frecuencia	Soya		Maíz		Boniato	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	47,4 ab	55,1 b	88, 8 a	93,8 ab	115,5 b	117,2 c
F1	43,0 b	54,7 b	80,2 b	84,0 b	119,5 b	122,6 c
F2	54,5 a	59,0 ab	92,8 a	97,0 a	126,8 a	134,6 b
F3	49,5 ab	63,4 a	93,5 a	94,9 a	138,9 a	141,5 a
ES <sub>x</sub>	1,8**	1,7**	1,8**	2,7**	2,6**	2,2**
Frecuencia	Soya		Girasol		Sorgo	
F0	50,2	51,0 b	205,1 b	203,0 b	91,6 b	94,2 b
F1	52,4	53,7 b	198,2 b	198,3 b	93,0 ab	101,5 b
F2	55,2	64,3 a	220,2 a	223,1 a	103,4 a	112,4 a
F3	56,0	66,1 a	232,2 a	229,5 a	106,6 a	110,1 a
ES <sub>x</sub>	2,3	3,6**	4,4**	7,2**	2,4**	2,5**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey para  $p \leq 0,01$

**Tabla 26. Extracciones de potasio (kg K<sub>2</sub>O.ha<sup>-1</sup>) por los cultivos en los experimentos 3 y 4.**

Frecuencia	Maíz		Tomate		Sesbania	
	Año I	Año II	Año I	Año II	Año I	Año II
F0	88,0 ab	93,1	152,0bc	137,0 b	111,1 b	115,0 b
F1	81,8 b	96,4	137,2 c	135,0 b	115,6 b	122,5 ab
F2	95,0 a	97,1	166,4 b	170,1 ab	132,8 a	144,5 a
F3	92,4 ab	98,1	186,4 a	178,2 a	135,9 a	150,8 a
ES <sub>x</sub>	1,8**	1,8 ns	4,7**	8,3**	2,5**	5,2**
Frecuencia	Arroz		Frijol		Boniato	
F0	97,6 b	94,8 b	64,0 b	73,6 b	131,0 b	129,3 b
F1	93,0 b	95,9 b	62,0 b	70,7 b	124,5 c	125,7 b
F2	104,9 a	101,8 ab	73,8 ab	75,9 ab	137,2 ab	134,2 ab
F3	106,7 a	108,7 a	85,5 a	82,4 a	144,0 a	141,7 a
ES <sub>x</sub>	3,8	2,8**	2,9**	2,4**	1,9**	2,1**

Medias con letras comunes no difieren significativamente según Dócima de Tukey para  $p \leq 0,01$

#### 4.5 Evaluación general de los efectos de las frecuencias de inoculación en las secuencias de cultivos.

Para determinar la influencia integral de las frecuencias de inoculación sobre el comportamiento de los cultivos en las secuencias, se realizó un análisis

factorial discriminante donde se incluyeron los resultados de todos los experimentos

Se encontró que la primera componente acumuló el 96,7 % de la variabilidad total entre los grupos, con valor  $\lambda$  significativo, lo que permitió discriminar las variables de mayor contribución a la formación de dicha componente C1 y que se relacionan a continuación: colonización micorrízica, densidad visual, contenido de esporas, extracción de fósforo, extracción de potasio, masa seca, agregados 5-2 mm (ts), agregados 1- 0,25 mm (th) e índice de estabilidad (le). La componente C2 no resultó importante en la discriminación ya que acumuló solo 3,3 % de la variabilidad entre los grupos.

En la Figura 15 se puede observar que todos los individuos que responden a cada frecuencias de inoculación se encuentran perfectamente agrupados. Así, donde se inoculan los dos primeros cultivos (F2) o todos los cultivos (F3) de las secuencias aparecen estrechamente reunidos en un grupo (GI) situado al extremo derecho del gráfico donde es mayor el efecto de las variables que contribuyeron a la formación de la componente 1. Mientras, aquellos correspondientes a la no inoculación (F0) están agrupados en la extrema izquierda (GIII), donde es mínimo el efecto de dichas variables. En una posición intermedia entre ambos grupos, y que se corresponde con un comportamiento también intermedio de las variables, se agrupan los individuos (GII) que integran la frecuencia donde sólo se inoculó el primer cultivo (F1).

Estos resultados corroboran que inoculando sólo los dos primeros cultivos (F2) se logran alcanzar resultados similares a cuando se inoculan los tres cultivos de una secuencia (F3), comportamiento que se manifiesta independientemente de los cultivos que se utilizaron en cada secuencia. Arihara y Karasawa (1999) en un estudio para evaluar los efectos de los cultivos precedentes sobre la colonización micorrízica, encontraron que todos los cultivos estudiados y que establecieron simbiosis con los hongos micorrízicos (maíz, girasol, papa y soya), aumentaron el nivel de colonización micorrízica y los rendimientos de los cultivos sucesivos.

Por tanto, siempre que logre establecer una simbiosis eficiente entre las plantas y los hongos MA se puede prescindir de una tercera inoculación, utilizando como base a los cultivos micotróficos como multiplicadores de los propágulos micorrízicos en el suelo. Esto permite disminuir, al mismo tiempo, la cantidad y el costo de aplicación tanto de los fertilizantes minerales como de los biofertilizantes, además de los correspondientes beneficios económicos y ambientales. Los resultados sirven de base para el manejo integral del sistema suelo-planta microorganismos dentro del ámbito de la agricultura sostenible.

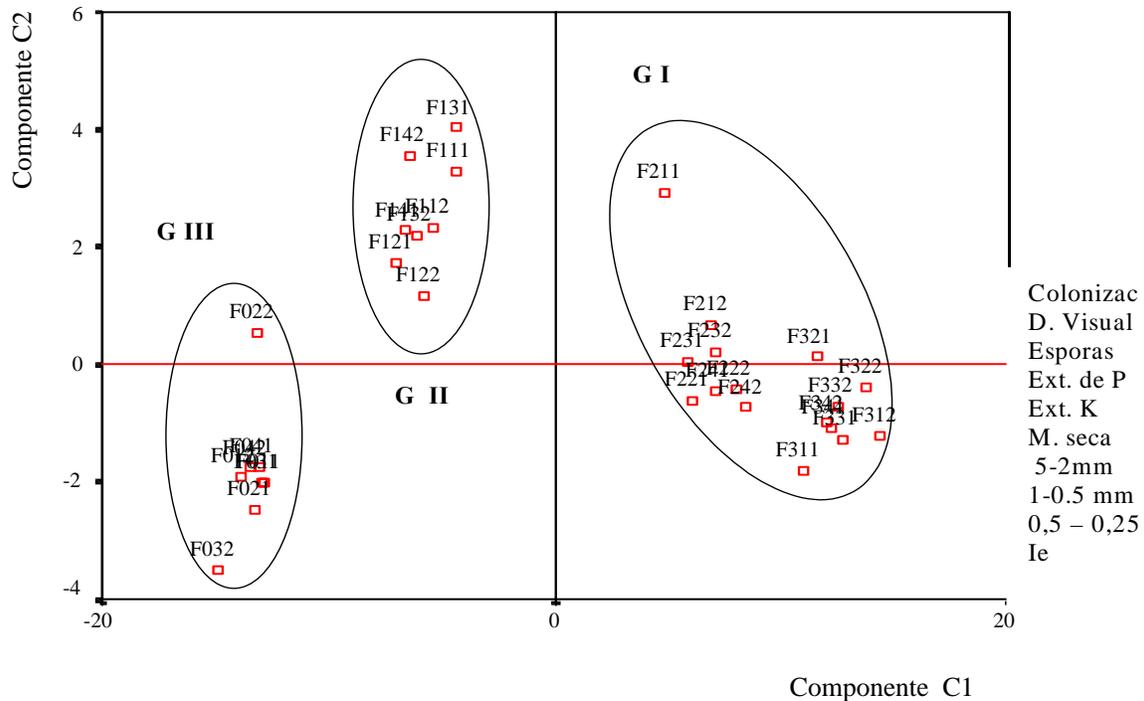


Figura 15 Distribución de las frecuencias de inoculación de las 4 secuencias en el análisis Factorial Discriminante

#### 4.6 Análisis de la factibilidad económica de las diferentes frecuencias de inoculación en las secuencias de cultivos.

A los efectos de determinar el efecto económico de las frecuencias de inoculación que mostraron mejor comportamiento agronómico y biológico, se realizó un análisis contable teniendo como base los rendimientos alcanzados por los cultivos en cada secuencia, el valor de dichas producciones agrícolas y los costos incluidos en el proceso productivo, a partir de los cuales se calcularon los beneficios correspondientes y los valores de la relación beneficio: costo (B:C).

En las Tablas 27 y 28, correspondientes a los experimentos 1 y 2 y 3 y 4, respectivamente, puede observarse que, en todos los casos, el valor de la producción se incrementa en la misma medida que se aumenta la frecuencia de inoculación, dado el incremento, en sentido general de los rendimientos. Por otra parte, en todos los casos, las diferencias en los costos de producción son mínimas entre las diferentes frecuencias.

**Tabla 27. Evaluación económica del empleo de diferentes frecuencias de inoculación en los experimentos 1 y 2.**

Frecuencia/ Cultivo	Rendimientos (t. ha <sup>-1</sup> )	Valor de la producción $\Sigma$ cultivos (\$ ha <sup>-1</sup> )	Costos $\Sigma$ cultivos (\$ ha <sup>-1</sup> )	Beneficios (\$ ha <sup>-1</sup> )	Relación B:C
<b>Experimento 1</b>					
F0	Soya Maíz Boniato	1,95 5,25 22,10	6 140,60	888,17	5 252,43 5,91
F1	Soya Maíz Boniato	2,18 5,57 22,90	6 505,44	875,26	5 630,18 6,43
F2	Soya Maíz Boniato	2,17 5,75 24,50	6 788,00	879,26	5 908,74 6,72
F3	Soya Maíz Boniato	2,37 5,75 25,10	7 009,80	909,26	6 100,54 6,71
<b>Experimento 2</b>					
F0	Soya Girasol Sorgo	1,91 1,82 2,72	1 525,56	818,98	706,58 0,86
F1	Soya Girasol Sorgo	2,21 1,85 2,64	1 647,58	795,33	852,25 1,07
F2	Soya Girasol Sorgo	2,27 2,10 2,73	1 732,76	796,93	935,83 1,17
F3	Soya Girasol Sorgo	2,30 2,20 2,82	1 776,72	808,08	968,64 1,20

A partir de los elementos anteriores y para todas las secuencias, tanto el beneficio económico como el valor de la relación beneficio:costo se incrementan con el aumento de la frecuencia de inoculación, aunque las diferencias son apenas notables entre F2 y F3, o sea, la inoculación de los dos primeros y de los tres cultivos de cada secuencia, respectivamente. Se destaca que las diferencias mayores se obtuvieron cuando se emplearon cultivos que respondieron en mayor grado a la micorrización, aspecto que debe tenerse en cuenta para la selección de los cultivos a incluir en una determinada secuencia. Por otra parte, los mayores valores de la relación B:C alcanzados en los experimentos 3 y 1 se deben a que los volúmenes de producción y/o los precios de venta de los cultivos incluidos en esos experimentos fueron más elevados. Además, en el experimento 3, el uso de la sesbania como abono verde, que económicamente no aporta beneficios

directos, siempre que se utilice en combinación con cultivos que logran altos beneficios no afectará el margen de ganancias de los productores y puede estimular su empleo como una práctica adicional de mejoramiento de las condiciones del suelo.

**Tabla 28. Evaluación económica del empleo de diferentes frecuencias de inoculación en los experimentos 3 y 4.**

Frecuencia/ Cultivo	Rendimientos (t. ha <sup>-1</sup> )	Valor de la producción ∑ cultivos (\$ ha <sup>-1</sup> )	Costos ∑ cultivos (\$ ha <sup>-1</sup> )	Beneficios (\$ ha <sup>-1</sup> )	Relación B:C	
<b>Experimento 3</b>						
F0	Maíz Tomate Sesbania	5,23 20,02 28,60	8 667,93	770,37	7 897,56	10,25
F1	Maíz Tomate Sesbania	5,45 20,70 27,10	8 976,16	764,77	8 211,39	10,74
F2	Maíz Tomate Sesbania	6,03 25,10 31,20	10 695,56	764,97	9 930,59	12,98
F3	Maíz Tomate Sesbania	6,10 26,20 32,05	11 100,96	771,22	10 329,74	13,39
<b>Experimento 4</b>						
F0	Arroz Frijol Boniato	1,10 1,72 23,60	1 733 5,5	1 318,02	16 017,28	12,15
F1	Arroz Frijol Boniato	1,12 1,70 24,30	1 756 3,08	1 336,02	16 22 7,06	12,15
F2	Arroz Frijol Boniato	1,20 1,80 26,40	1 866 5,84	1 347,52	17 31 8,32	12,86
F3	Arroz Frijol Boniato	1,18 1,85 27,30	1 922 5,97	1 377,52	17 84 8,45	12,96

Los resultados alcanzados demuestran la factibilidad económica del uso en plantas cultivadas de la inoculación con hongos micorrízicos y rizobacterias por sus beneficios monetarios directos, así como las ventajas complementarias que se derivan de utilizar el post-efecto micorrízico para hacer un uso más racional de los inoculantes en secuencias de cultivos.

## V. Conclusiones

1. La inoculación con hongos micorrízicos incidió favorablemente sobre el desarrollo de todos los cultivos evaluados, pero el grado de intensidad de los valores alcanzados por los parámetros fúngicos evidenció marcadas diferencias entre ellos. Los mayores niveles de producción de masa seca, extracción de nutrientes y rendimiento se obtuvieron cuando se inocularon, al menos, dos cultivos de cada secuencia, donde se alcanzaron, además, los valores más elevados de colonización fúngica y densidad visual.
2. El contenido de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en el suelo aumentó considerablemente con el desarrollo de las secuencias de cultivos, alcanzando los mayores valores con las frecuencias de inoculación más altas, excepto cuando se empleó la sesbania como abono verde, donde se produjo una fuerte disminución del número de esporas al ser incorporadas las plantas al suelo antes de concluir su ciclo biológico, lo que implica la necesidad de inocular el cultivo sucesor. Los hongos micorrízicos nativos tendieron a incrementar ligeramente su esporulación con el desarrollo de las secuencias, pero no llegaron a alcanzar valores que permitieran garantizar una eficiente colonización micorrízica de los cultivos.
3. La coinoculación con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias corroboró ser una práctica más efectiva sobre las plantas que la inoculación simple con rizobacterias. El aumento significativo de las poblaciones de *Burkholderia cepacia* y *Azospirillum brasilense* en las variantes coinoculadas evidencia el efecto positivo de los hongos micorrízicos sobre el desarrollo de otros microorganismos del suelo.
4. Las secuencias de cultivos tuvieron efectos muy positivos sobre la fertilidad del suelo. El contenido de materia orgánica aumentó en todas las secuencias estudiadas, pero fue superior en aquellas donde los cultivos establecidos aportaron mayores volúmenes de masa seca. Similar comportamiento mostró el pH, mientras el contenido de potasio tendió, en general, al aumento de su disponibilidad después de la incorporación de los residuos vegetales, alcanzando su valor máximo cuando se incorporó la sesbania como abono verde. Por su parte, el contenido de fósforo se mantuvo relativamente estable, con ligera tendencia a la disminución.
5. Con la aplicación de las frecuencias más elevadas de inoculación con hongos micorrízicos arbusculares se logró mejorar las proporciones de

agregados del suelo de mayor tamaño, así como su estabilidad y, al mismo tiempo, disminuir los valores del coeficiente de dispersión, lo que permite evitar la progresiva disminución de las cualidades físicas del suelo típicas del cultivo continuado.

6. Todas las secuencias utilizadas mostraron, además, ser factibles económicamente, aunque la magnitud del beneficio va a depender de los cultivos empleados en cada secuencia. De igual forma, siempre se encontró un efecto económico positivo al inocular las plantas con hongos MA y rizobacterias, el cual se incrementa con el aumento de la frecuencia de inoculación con HMA.

## VI. Recomendaciones

1. Utilizar la coinoculación con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias en los diferentes cultivos de las secuencias para aumentar la eficiencia en la absorción de nutrientes, los rendimientos y conservar o mejorar la fertilidad y las propiedades físicas del suelo.
2. Cuando se trabaje con secuencias de cultivos, se deben coinocular, al menos, los dos primeros cultivos para hacer un uso eficiente del post-efecto micorrízico. No resulta necesario inocular con hongos MA los cultivos que se propagan mediante semillas agámicas o de difícil inoculación por el método de recubrimiento, siempre que los dos cultivos precedentes logren una buena colonización y completen su ciclo de vida.
3. Tener en cuenta la disminución del número de labores de cultivo para garantizar una mayor viabilidad de los propágulos micorrízicos una vez removidos los cultivos precedentes y realizar un monitoreo sistemático del impacto de la inoculación sobre las propiedades físicas del suelo
4. Continuar el estudio de los efectos de la micorrización sobre las características físicas del suelo y sus mecanismos de acción, en especial la producción de glomalina, bajo diferentes condiciones edafoclimáticas.
5. Continuar los estudios de las interacciones hongos MA – rizobacterias – plantas que permitan garantizar poblaciones microbianas equilibradas para el mejoramiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos y el mejor desarrollo de las plantas.
6. Que esta Tesis constituya un material de consulta para estudiantes de pre y posgrado e investigadores en las Ciencias Agrícolas.

## VII. Referencias

1. Ajwa, H.A. and Tabatabai, M.A. 1994. Descomposition of different organic materials in soil. **Biol. Fert. Soils**, 18: 175-182.
2. Alfonso, C.A., Riverón, M., Hernández, S. y Tejera, J.L. 1994. Influencia de los abonos verdes sobre las propiedades de los suelos y el reciclaje de nutrientes. Informe de Resultados. 34 p. Instituto de Suelos, Las Habana.
3. Almendras, A. 2000. Comparison of aggregate stability and glomalin among Philippine soils. Disponible en <http://www.nps.usda.gov/publication/htm>. Rev: 07/12/02.
4. Alvarenga, R.C., Fernandes, B., Silva, T.C.A. y Rezende, M. 1986. Estabilidade de agregados de um Latossolo sob diferentes metodos de preparo de solo e de manejo da palha do milho. **Rev. Bras. Ciencia do Solo**, 10: 273-277.
5. Álvarez, M. 1999. 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 Ciencias en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. INCA, La Habana.
6. Allen, F.M. 2001. Modeling arbuscular mycorrhizal infection. Is % infection an appropriate variable? **Mycorrhiza**, 10: 255-258
7. Amaya, L.A., Leal, A. y Lares, C. 1996. Efecto de diferentes dosis de fósforo sobre la relación tripartita *Rhizobium*-frijol-MVA. Mem. XVIII Reunión Latinoam. Rhizobiología, p. 49-50, Sta Cruz de la Sierra.
8. Anderson, R.C and Liberta, A.E. 1992. Influence of supplemental inorganic nutrients on growth, survivorship and mycorrhizal relationship of *Schizachyrium scoparium* (Poaceae) growth in fumigate and unfumigate soil. **Am. J. Bot.**, 79: 406-414.
9. Andrade, G., Linderman, R. and Bethlenfalvay, G. 2001. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Disponible en <http://www.icom2.slu.se./ABSTRACTS/abstract.htm>. Rev: 14/04/02
10. Andrade, G., Linderman, R.G. and Bethlenfalvay, G.J. 1998. Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant and Soil**, 202: 79-87.

11. Arihara, J. and Karasawa, T. 1999. Effect of previous crops on arbuscular mycorrhizal formation and growth of succeeding maize. **Soil Sci. Plant Nutr.**, 46 (1): 43-51.
12. Azcon, R., Ruiz-Lozano, J. and Rodriguez, R. 2001. Differential contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to plant nitrate uptake ( $^{15}\text{N}$ ) under increasing N supply to the soil. **Can. J. Bot.**, 79 (10): 1175-1180.
13. Azcón-Aguilar, C. and Barea, J.M. 1991. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: Mycorrhizal functioning. An integrative plant- fungal process. Chapman y Hall, New York.
14. Baath, E. and Spokes, J. 1989. The effect of added nitrogen and phosphorus on mycorrhizal grown response and infection in *Allium*. **Can J. Bot.**, 67: 3221-3232.
15. Barber, R.G. 1994. Rotaciones de cultivos en zonas con 1000 a 1300 mm de lluvia por año en el Departamento de Santa Cruz, Bolivia. Capítulo 13 del "Manual de manejo de suelos para agricultores mecanizados", Santa Cruz.
16. Barea, J.M., Azcon, R. and Azcon-Aguilar, C. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Int. J. Gen. Molec. Microbiol.**, 81(1-4): 343-351.
17. Barea, J.M., Azcón, R. and Azcón-Aguilar, C. 1992. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen fixing systems. En: Methods in Microbiology. Vol 24: 391-346, Academic Press, New York.
18. Basham, Y. and Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenger for agriculture. **Can. J. Microbiol.**, 36: 591-608.
19. Bashan, Y. 1999. Interaccion of *Azospitillum* spp in soil. A review. **Biol. Fert. Soils**, 29: 246-256.
20. Bashan, Y. and Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Can. J. Microbiol.**, 43:103-121.
21. Bashan, Y., Holguín, G. y Ferrera-Cerrato, R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. **Terra**, 14 (2): 159-195.

22. Bearden, B.N. and Petersen, L. 1999. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vermisol. **Plant and Soil.**, 218 (1-2): 173-183.
23. Bekunda, M.A., Batioino, A. and Ssali, H. 1997. Soil fertility management in Africa: A review of selected research trials.
24. Bending, G.D and Read, D.J. 1997. Lignin and soluble phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. **Mycol. Research**, 101: 1348-1354.
25. Bethlenfalvay, G.J. and Schuepp, H. 1994. Arbuscular micorrizal fungi and agrosystem stability. Am. Soc. Agron. Spec. Pub. 54, Madison.
26. Bowen, G.D. 1991. Microbial dynamics in the rhizosphere. Possible strategies in managing rhizosphere populations. En: D.L Keister and P.B. Cregan (eds). The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
27. Brundrett, M.C and Kendrick, W.B. 1990. The roots and mycorrhizae of herbaceous woodland plants. II. Structural aspects of morphology. **New Phytol.**, 114: 469-479.
28. Buerkert A., Bationo, A and Dossa, K. 2000. Mechanisms of residue mulch induced cereal growth increases in West Africa. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, 64: 346-358.
29. Bunch, R. 1995. Principles of agriculture for the humid tropics. An odyssey of discovery. ILEA Newsletter, p 18-19, Oct. 1995.
30. Burgess, M.S., Mehuys, G.R. and Madramootoo, C.A. 2002. Decomposition of grain-corn residues (*Zea mays* L.). A litterbag study under three tillage systems. **Can. J. Soil Sci.** 82: 127-138.
31. Calderón, F.J., Jackson, L.E., Scow, K. and Rolston, D.E. 2000. Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. **Soil Biol. Biochem.**, 32 (11-12): 1547-1559.
32. Calderon, V.R. 1996. Situación actual de la rizobiología en El Salvador, América Central. Mem. XVIII Reunión Latinoam. Rizobiología, p. 381-382, Sta Cruz de la Sierra.
33. Calegaty, A. 1995. Leguminosas para adubacao verde de invierno no sudoeste de Paraná. IAPAR. Bol. Tec. 35, Londrina.

34. Camel, S.B., Reyes-Solis, M.G., Ferrera-Cerrato, R., Franson, R.L., Brown, M.S. and Bethlenfalvay, G. 1991. Growth of vesicular-arbuscular mycorrhizas mycelium through bulk soil. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, 55: 389-393.
35. Campos, B.C., Reinert, D.J., Nicolodi, R., Ruedell, J. y Petrelle, C. 1995. Estabilidade estrutural de um Latossolo Vermelho-Escuro distrofico apos sete anos de rotacao de culturas e sistemas de manejo. **Rev. Bras. Ciencia do Solo**, 19: 121-126.
36. Cancio, T., Peña, J.L. y Peña, F. 1989. Uso de los abonos verdes en áreas tabacaleras de la región del Escambray. **Centro Agrícola** (Cuba), 16 (4): 59-67.
37. Cannel, R.Q. and Hawes, J.D. 1994. Trends in tillage practices in relation to sustainable crop production with special reference to temperate climates. **Soil Tillage Res.**, 30: 245- 282.
38. Cass, A., Gusli, S. and MacLeod, D.A. 1994. Sustainability of soil structure quality in paddy rice-soya bean cropping systems in South Sulawesi, Indonesia. **Soil Tillage Res.**, 31:339-352.
39. Castellanos, T., Ascencio, F. and Bashan, Y. 1998. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. **Curr. Microbiol.**, 36, (4):.241-244.
40. Castro, F. 2000. Apuntes para una agenda del sur: Nuevo milenio en desarrollo. **Ciencia, Innovación y Desarrollo** (Cuba), 5 (2): 23-45.
41. Corbera, J. 1998. Coinoculación con *Rhizobium japonicum*-micorriza vesículo arbuscular como fuente alternativa de fertilización para el cultivo de la soya. **Cult. Trop.** (Cuba), 19 (1): 17-20.
42. Cordier, C., Pozo, M.J., Barea, J.M., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Cell defence responses associated with localized and systematic resistance to *Phytophthora parasitica* induced by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 11: 1017-1028.
43. Cornejo, S., Zviertovich, G. y Campano, N. 1996. Evaluación del uso y manejo de los inoculantes Rhizolam en el distrito de Chiguata, Arequipa, Perú. Mem. XVIII Reunión Latinoam. Rhizobiología, p. 383-384, Sta Cruz de la Sierra.
44. Correa J.C. 2002. Efeito de sistemas de cultivo na estabilidade de agregados de um Latossolo Vermelho-Amarelo em Querência, MT, **Pesq. Agropec. Bras.**, 37 (2): 203-209.

45. Creus, C.M., Sueldo, R.J and Barrassí, C.A. 1996. *Azospirillum* inoculation in pregerminating weheat seeds. **Can. J. Microbiol.**, 42(1): p 83-86.
46. Cuba MINAG. 2002. Listado Oficial de Precios de Acopio, La Habana.
47. Cuba INCA. 2000. Listado de Precios de los Biofertilizantes, La Habana.
48. Cuba MINAG. 1999. Listado Oficial de Precios de Servicios Agropecuarios. Resolución No. 244-99, La Habana.
49. Cuba MINAG. 2002. Listado Oficial de Precios de Semillas, La Habana.
50. Chu, E.Y.y Diekmann, U. 1994. Efeito das actividades agricolas em populacao de fungo endomicorrízico nativo do solo da Amazonia Oriental. Res. V REBRAM, Univ. Federal Sta. Catarina, Florianópolis.
51. Da Costa, M.B. 1991. Adubacao verde no sul do Brasil, Río de Janeiro.
52. Damba, H. 1994. Biofertilización en el cultivo de la soya. Trabajo de Diploma. ISCAH, La Habana.
53. Darmody, R.G. and Norton, L.D. 1994. Structural degradation of a prairie soil from long-term management. **Soil Sci.**, 22: 641-649.
54. De la Cruz, A., Poplawsky, O. and Wiese, M.V. 1992. Biological suppression of potato ring rot by fluorescent *Pseudomonas*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 58 (6): 234-239.
55. Degens, B.P., Sparling, G.P. and Abbott, L.K. 1994. The contribution from hyphae, roots and organic carbon constituents to the aggregation of a sandy loam under long-term clover-based and grass pastures. **Eur. J. Soil Sci.**, 45: 459-46
56. Dehne, H.W. 1988. Influence of soil, cultivation and host plant genotype on the occurrence of VA mycorrhizal fungi in different crops. Abst. Sec. Europ. Symp. on Mycorrhiza, p 25-26, Prague.
57. Del Gallo, M. and Frenrik, I. 1994. The rizosphere and *Azospirillum*. En: Okon, Y. (ed.) *Azospirillum/plant association*. CRC Press, Boca Raton
58. Díaz, G. 1990. La rotación de cultivos y la incorporación de abonos verdes en las arroceras. Conferencia. INCA, Los Palacios.
59. Díaz, G. 1998. El cultivo del arroz en Cuba. Conferencias a productores y técnicos de arroz de Casanare, Colombia. 44 p., INCA.
60. Eason, W.R., Newman, E.I. and Chuba, P.N. 1991. Specificity of interplant cycling of phosphorus: the role of mycorrhizas. **Plant and Soil**, 137: 267-274.

61. Ellis, J.R., Roder, W. and Mason, S.C. 1992. Grain sorghum-soybean rotation and fertilization influence on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, 56: 789-794.
62. Eory, V.J., Momo, F.R. and Alvarez, M. 1995. Growth and survival of *Azospirillum* in the roots and rhizosphere of maize at different levels of acidity. **Microbiol.**, 27 (2): 99-105.
63. Espindola, J.A. 1994. Influencia da adubacao da batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam). Res. V REBRAM, p. 46. Univ. Federal Sta Catarina, Florianópolis.
64. FAO. 1980. Los fertilizantes y su empleo. Guía de bolsillo para extensionistas. Roma.
65. FAO. 1993. Integrated plant nutrition systems. Fert. and Plant Nutrition Bull. 19, Roma.
66. FAO. 1994. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Dilema del desarrollo y las políticas forestales, Roma.
67. Fardeau, J.C. 1999. Assessment of nutrient availability from organic wastes use in agriculture. Proc. 8<sup>th</sup> Int. Conf. on Management Strategies for Organic Wastes Use in Agriculture: 85 –100. Cemagref Ed., Paris.
68. Febles, J.M. 1999. Estrategias agroecológicas para la conservación de suelos. Conferencias Curso de Maestría en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. INCA, La Habana.
69. Fernández, A.I. 1995. *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense*. Sus relaciones con maíz y caña de azúcar. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Fac. Biología, Univ. de la Habana.
70. Fernández, C. y Novo, R. 1988. Vida microbiana en el suelo. 2da Ed. Pueblo y Educación, La Habana.
71. Fernández, F. 1997. Uso, manejo y comercialización de los hongos micorrízicos VA. Conferencias en Curso de Maestría de Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. INCA, La Habana.
72. Fernández, F. 1999 Manejo de las asociaciones micorrízicas arbusculares sobre la producción de posturas de cafeto (*C. Arábica* L. var. Catuaí) en algunos tipos de suelos. Tesis de grado (Dr. en Ciencias Agrícolas), INCA 102p.,
73. Fernández, F., Gómez, R., Martínez, M.A. y de la Noval, B.M. 2001 Producto inoculante micorrizógeno. Patente No. 22 641. Cuba.

74. Flores, E.L. 1997. Las relaciones químicas suelo-planta y la fertilidad. Centro Editorial de Caldas, Manizales.
75. Flores, T. 1984. Evaluación técnico-económica de la tecnología del aprovechamiento del suelo con dos siembras anuales de arroz o una con distintos precedentes culturales. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. ISCAH, La Habana.
76. Franzluebbers, A., Wright, S. and Stuedeman, J. 1999. Soil aggregation and glomalin under pastures in the Southern Piedmont USA. **Soil Sci. Soc. Am. J.** Disponible en <http://www.nps.usda.gov/publication/htm>. Rev: 07/12/02.
77. Freitas, J.R. and Germida, J.J. 1990. Plant growth-promoting rhizobacteria for winter wheat. **Can. J. Microbiol.**, 36:265-272.
78. Gaikwad, A.P. and Bhate, S.B. 1996. Effect of different strains of *Azospirillum* on yield of wheat. **J. Environ. Biol.**, 17 (4): 305-309.
79. Garbaye, J and Duponnois, R. 1991. Specificity and function of mycorrhization helper bacteria (MHB) associated with the *Pseudotsuga menziessi-Laccaria laccata* symbiosis. Proc. Int. Symbiosis Cong., Jerusalem.
80. García, M. 1997. Los abonos verdes, una alternativa natural y económica para la Agricultura. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. INCA, La Habana.
81. Gavito, M. and Miller, H.M. 1998. Early phosphorus nutrition, mycorrhizae development, dry matter partitioning and yield of maize. **Plant and Soil**, 199:177-186.
82. Gerdemann, J.W. and Nicholson, T.H.. 1963. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 46: 235-244.
83. Ghidry, F. and Albert, E.E. 1993. Residue type and placement effects and decomposition. Field study and model evaluation. **Trans. ASAE**, 36: 1611-1617.
84. Giovannetti, M. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. En: Kapulnik, Y. and Douds, D.D. (eds.). Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
85. Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytol.**, 84: 489-500.

86. Gomero, L. y Velásquez, H. 2001. Bases conceptuales y programáticas para el manejo ecológico de suelos. Disponible en: <http://www.adas.co.uk>. Rev: 15/10/ 02.
87. Gómez. R y Muñoz, H. A. 1998. La biofertilización del ajo (*Allium sativum* L.) en suelo Ferralítico Rojo compactado. **Cult. Trop.** (Cuba), 19 (2): 9-13.
88. Gori, A. and Favilla, F. 1995. First results on individual and dual inoculation with *Azospirillum–Glomus* on wheat. **Ecol. Sci.**, 37: 245-249.
89. Grant, C.A., Flaten, D.N., Tomaszewicz, D.J. and Sheppard, S.C. 2001. The importance of early season phosphorus nutrition. **Can. J. Plant Sci.**, 81(2): 211-224.
90. Grant, C.A., Peterson, G.A. and Campbell, C.A. 2002. Nutrient considerations for diversified cropping systems in the northern Great Plains. **Agron. J.**, 94 (2): 186-198.
91. Grimes, H.D. and Mount. N.S. 1987. Influence of *Pseudomonas putidas* on nodulation of *Phaseolis vulgaris*. **Biol. Biochem.**, 16: 27-30.
92. Gryndler, M. 2000. Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. En: Kapulnik, Y. and Douds, D.D. (eds.). Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
93. Guiller, K.E., Cadissh, G., Ehaliotis, C., Adams, E., Sakala, W.D. and Manfोगoya, P.L. 1997. Building soil nitrogen capital in Africa. En: Bures, R..J. (ed.). Replenishing soil fertility in Africa. SSSA Spec. Pub. 51, Madison.
94. Gutierrez, N.C., Gutierrez, J.R. y Venialgo, C. 1999. Efectos de distintos sistemas de labranza y cultivo sobre la estabilidad de los agregados y el contenido de materia orgánica en un Haplustol óxico. Com. Científ. Tecnol. UNNE: 5-190 al 5-192.
95. Habte, C.M. and Soedarejo, M. 1995. Limitation of arbuscular mycorrhizal activity in *Leucaena leucocephala* by Ca insufficiency in an acid Mn-rich soil. **Mycorrhiza**, 5: 387-394.
96. Haggar, J.P. 1993. Nitrogen dynamics of tropical agroforestry and annual cropping systems. **Soil Biol . Biochem.**, 25 (10 ): 1363-1378 .
97. Hawkins, H.J. and George, E. 1999. Effect of plant nitrogen status on the contribution of arbuscular mycorrhizal hyphae to plant nitrogen uptake. **Physiol. Plant.**, 105: 694-700.

98. Hebbbar, K., Martel, M. and Heulin, T. 1994. *Burkholderia cepacia*, a plant growth promoting rhizobacteria associate of maize. Proc.Third Int. Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria: 201-203.
99. Henriksen, T.M. and Breland, T. 1999. Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil. **Soil Biol. Biochem.**, 31: 1121-1134.
100. Hernández, A, Santos, R. y Casanova, A. 1998. Clasificación y principios básicos de los sistemas de cultivos múltiples o policultivos. **Agric. Org.** (Cuba), 4 (2): 13-17.
101. Hernández, A. 1998. Caracterización de cepas de *Pseudomonas cepacia* y *P. fluorescens* aisladas en la rizosfera del maíz. Tesis de Maestría en Ecol. Microb. INCA, La Habana.
102. Hernández, A. 2002. Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L.). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. INCA, La Habana.
103. Hernández, A. y Hernández, A.N. 1996. Efecto de la interacción *Rhizobium*-MA en el cultivo de la soya (*Glycine max* (L) Merrill). **Cult. Trop.** (Cuba), 17 (1): 5-7.
104. Hernández, A., Pérez, J., Bosch., D. y Rivero, L.D. 1999. Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Inst. Suelos, AGRINFOR, La Habana. 64 p.
105. Hernández, A.N. Hernández, A. y Heydrich, M. 1998. Estudios fisiológicos-bioquímicos con cepas de rizobacterias promisorias para la biofertilización en maíz. **Cult. Trop.** (Cuba), 19 (1): 5-8.
106. Hernández, A.N., Hernández, A. y Heydrich, M. 1995. Selección de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz. **Cult. Trop.** (Cuba), 16 (3): 5-8.
107. Hernández, G., Cuenca, G. y García, A. 2002. Influencia de micorrizas arbusculares sobre el crecimiento y la utilización de nutrientes en *Vigna luteola*. Prog. Res. XIII Cong. Científ. INCA,. p. 67, La Habana.
108. Hernández, M. y Guzmán, L. 2002. Efectos de la biofertilización en el cultivo de la soya. Prog. Res. XIII Cong. Científ. INCA,. p. 113, La Habana.

109. Hernández, M.I. 2000. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como complemento de la nutrición mineral de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Tesis de Maestría en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. INCA, La Habana.
110. Hernández, T. 1997. Cultivos alternativos para sistemas de rotación en el arroz. 1. Uso de plantas leguminosas y oleaginosas. **Cult. Trop.** (Cuba), 18 (2): 24-27.
111. Hernández, T. 1999. La rotación de cultivos. Una alternativa para la producción sostenible de arroz en las condiciones de P. del Río. Tesis de Maestría en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. INCA, La Habana.
112. Hernández, Y., Sarmiento, M. y García, O. 1996. Influencia del método de inoculación con *Azospirillum* en el comportamiento de gramíneas de pastos. **Ciencias Agric.** (Cuba), 30: 225.
113. Herrera, R.A. 1995. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. En: Maximina Monasterio (ed.) Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, evolución y procesos sociales. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma XII Diversidad Biológica, Mérida.
114. Holderbaum, J.F. 1990. Fallseeded legume cover crops for no tillage corn in the humid east. **Agron. J.**, 82: 117-124.
115. Huang, Z.V.. 1991. The evaluation of soil and fertilizer resources in China. 12p.
116. Inghan, E. and Molina, R. 1991. Interaction among mycorrhizal fungi, rhizosphere organisms and plants. En: Microbial mediation of plant-herbivore interactions: 169-197.
117. Janos, D.P., Sahley, C.T. and Emmons, L.H. 1995. Rodent dispersal of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Amazonian Peru. **Ecol.**, 76: 1852-1858.
118. Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I.R. and Frossard, E. 2002. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. **Mycorrhiza**, 12 (5): 225-234.
119. Jarstfer, A. and Farner, G. 1998. Arbuscular mycorrhizal development and fungi reproductive behaviour. **Mycorrhiza**, 8 (5): 237-242.

120. Jeffries, P. and Barea, J.M. 2003. Arbuscular mycorrhiza. A key component of sustainable plant-soil ecosystems. En: Hock, B. (ed.). The mycota. Vol IX: Fungal Associations, Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg-New York.
121. Jitendra, P., Srivastava, N., Nigel, J.H., Douglas, A. and Forno, T. 1996. Biodiversity and agricultural intensification. The World Bank. Washington DC.
122. Joao J. P. 2002 Efectividad de la inoculación de cepas de HMA en la producción de posturas de cafeto sobre suelos Ferralítico Rojo compactado y Ferralítico Rojo Lixiviado de montaña. Tesis de Maestría "Nutrición de las plantas y Biofertilizantes" INCA, 85p.,
123. Johnson, N C., Copeland, P.J. and Pflieger, F.L. 1992. A possible explanation for yield decline associated with continuous cropping of corn and soybean. **Mycorrhiza**, 2 (4): 387-390.
124. Johnson, N.C., Fleger, F.L., Crookston, R.K., Simmons, S.R. and Copeland, P.J. 1991. Vesicular- arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. **New Phytol.**, 117: 657-663.
125. Jones, C.G., Lawton, J.H. and Shachak, M. 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. **Ecol.**, 78: 1946-1957.
126. Kabir, Z., O'Halloran, I.P. and Hamel, C. 1997. Overwinter survival of arbuscular mycorrhizal hyphae is favored by attachment to roots but diminished by disturbance. **Mycorrhiza**, 7 (4 ): 197-200.
127. Kahindi, J.H., Woomer, P., George, T., de Sousa, F.M., Karanja, N.K. and Giller, K.E. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics. The role of nitrogen- fixing bacteria. **Appl. Soil Ecol.**, 6(1): 55-76.
128. Karasawa, T.; Kasahara, Y. and Takebe, M. 2001. Variable response of growth and arbuscular mycorrhizal colonization of maize plants to preceding crops in various types of soils. **Biol. Fert. Soils**, 33 (4): 286-293.
129. Kaúrichev, I.S. 1984. Prácticas de edafología. Ed. Mir, Moscú.
130. Khammas, K.M., Ageron, E., Gremont, P.A.D. and Kasier, P. 1994. The nitrogen-fixing bacteria from Iraqui rice-field soils. **Eur. J. Soil Sci.**, 30 (3):101-106.

131. Klironomos, J.N. and Hart, M. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculums. **Mycorrhiza**, 12 (2): 181-184.
132. Klironomos, J.N., Rillig, M.C. and Allen, M.F. 1999. Designing below-ground field experiments with the help of semi-variance and power analyses. **Appl. Soil Ecol.**, 12: 227-238.
133. Koide, R.T. 2000. Mycorrhizal symbiosis and plant reproduction. En: Kapulnick, Y. and Douds, D.D. (eds.). *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
134. Korsaeath, A., Molstad, L. and Baker, L.R. 2001. Modeling the competition for nitrogen between plants and microflora as function of soil heterogeneity. **Soil Biol. Biochem.**, 33: 215-226.
135. Lara, D. 1999. Evaluación de sustratos y biofertilizantes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) utilizando la tecnología de cepellones. Tesis de Maestría en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. INCA, La Habana.
136. Lawrence, J.F. and Milner, R. 1996. Associations between arthropods and fungi. En: Orchard, A.E. (ed.). *Fungi of Australia*. Vol. 1B. Introduction. Fungi in the environment. ABRIS/CSIRO, Canberra.
137. Lee, P.J. and Koske, R.E. 1994. *Gigaspora gigantea*- parasitism of spores by fungi and actinomycetes. **Mycol. Res.**, 98: 458-466.
138. Lerch, G. 1977. *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*. Ed. Científico- Técnica, La Habana.
139. Li, X.L., George, E. and Marchner, H. 1991. Phosphorus depletion and pH decrease at root-soil and hyphae-soil interfaces of VA mycorrhizal white clover fertilized with ammonium. **New Phytol.**, 119: 397-404.
140. Lindahl, B., Stenlid, J., Olsson, S. and Finlay, R. 1999. Translocation of <sup>32</sup>P between interacting mycelia of a wood-decomposing fungus and ectomycorrhizal fungi in microcosm systems. **New Phytol.**, 144: 183-193.
141. Linderman, R.G. 1988. Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora. The mycorrhizosphere effect. **Phytopat.**, 78: 366-371.
142. Little, L.R. and Maun, M.A. 1996. The 'ammophila problem' revisited: a role for mycorrhizal fungi. **J. Ecol.**, 84: 1-7.

143. Liu, A., Hamel, C., Elmi, A., Costa, C., Ma, B and Smith, D.L. 2002. Concentrations of K, Ca and Mg in maize colonized by arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. **Can. J. Soil Sci.**, 82 (3): 271-278.
144. Lizhi, C. 1991. The studies on green manure in China. CAAS, Beijing.
145. Mansfeld-Giese, K., Larsen, J. and Bødker, L. 2002. Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Microb. Ecol.**, 41 (2): 133-140.
146. Marschner, H. 1998. Soil-root interface: biological and biochemical processes. En: Soil chemistry and ecosystem health. SSSA Spec. Pub., Madison.
147. Marschner, H. and Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil.**, 159: 89-102.
148. Marschner, H., Crowley, D. and Sattelmacher, B. 1997. Root colonization and iron nutritional status of *Pseudomonas fluorescens* in different plant species. **Plant and Soil.**, 196: 311-316.
149. Martínez, R. 1994. El uso de biofertilizantes. Curso de Agricultura Orgánica. ICA. La Habana.
150. Martínez, R. y Hernández, G. 1995. Los biofertilizantes en la agricultura cubana. Mem. II Enc. Nac. Agric. Org., p. 43-47, Villa Clara.
151. Mayea, S. 1995. Los biofertilizantes y su acción fitopatógena. Mem. III Enc. Nac. Bioplaguicidas y EXPOCREE, p. 41. INISAV, La Habana.
152. McGonigle, T.P. and Miller, M.H. 1996. Development of fungi below ground in association with plants growing in disturbed and undisturbed soils. **Soil Biol. Biochem.**, 28: 263-269.
153. McIlwee, A.P and Johnson, C.N. 1998. The contribution of fungi to the diets of three mycophagous marsupials in *Eucalyptus* forests revealed by stable isotope analysis. **Funct. Ecol.**, 12: 223-231.
154. Michelena, R., Morrás, H. y Irurtia, C. 1996. Degradación física por agricultura continua de un suelo franco limoso de la provincia de Córdoba. Mem. XV Cong. Argentino Ciencia del Suelo: 25-26.
155. Miller, M., McGonigle, T. and Addy, H. 1994. An economic approach to evaluate the role of mycorrhizas in managed ecosystems. **Plant and Soil.**, 159 (1):27-35.

156. Miller, M.H., McGonigle, T.P. and Addy, H.D. 1995. Functional ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizas as influenced by phosphate fertilization and tillage in an agricultural ecosystem. **Crit. Rev. Biotech.**, 15: 241-255.
157. Miller, P.R. 1990. Cultivos de cobertura para la agricultura de California. Agronomy Progress Report.
158. Miller, R.M and Jastrow, J.D. 1992. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. En: Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA. Spec. Pub. 54, Madison.
159. Miller, R.M and Jastrow, J.D. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. En: Kapulnick, Y. and Douds, D.D. (eds.). Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
160. Miller, R.M. 1993. Mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* **Microbiol.**, 23 (3): 124 -128.
161. Miller, R.M., Hetrick, B.A. and Wilson, G.W. 1997. Mycorrhizal fungi affect root stele tissue in grasses. **Can. J. Bot.**, 75: 1778-1784.
162. Minerdi, D., Fani, R., Gallo, R. and Bonfante, P. 2003. Identification of nitrogen fixation genes in *Burkholderia* endosymbionts of arbuscular mycorrhizal fungi. Disponible en <http://www.-icom2.se/ABSTRACT.html>. Rev: 28/04/03.
163. Mora, L.R. 1998. Actividad nitrogenasa en *Mucuna deeringianum* y *Canavalia ensiformis* asociadas a maíz en 2 localidades del municipio de Santa Maria Chemalapa, Oaxaca, México. Tesis de Ingeniería en Agroecología, Chapingo.
164. Morin, C., Samson, J. and Dessureault, M. 1999. Protection of black spruce seedlings against *Cylindrocladium* root rot with ectomycorrhizal fungi. **Can. J. Bot.**, 77: 169-174.
165. Newsham, K.K., Fitter, A.H. and Watkinson, A.R. 1995. Arbuscular mycorrhizal protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. **J. Ecol.**, 83: 991-1000.
166. Nosto, P., Bless, L.C. and Cook, F.D. 1994. The association of free living bacteria with the roots of high artic graminoids. **Arot. Alp.Res.**, 26: 180-186.
167. Novo, R. 2002. Los biofertilizantes y la biofertilizacion. Conferencias Curso Internacional de Microbiología del Suelo, Quito.

168. Ocio, J.A., Broker, P.C. and Jerkinson, D.S. 1991. Field incorporation of straw and its effects on soil microbial biomass and soil inorganic N. **Soil Biol. Biochem.**, 23: 171-176.
169. Olsson, P.A., Bååth, E., Jacobson, I. and Söderstrom, B. 1996. Soil bacteria respond to presence of roots but not to mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biol. Biochem.**, 28: 463-470.
170. Orellana, J.A y Pilatti, M.A. 1999. La estabilidad de agregados como indicador edáfico de sostenibilidad. **Ciencia del Suelo** (Cuba), 12: 75-80.
171. Orellana, R., Valdés, M., Hernández, O. y Quintero, P.L. 1995. Consecuencias de la aplicación excesiva de fertilizantes minerales en el estado físico de los suelos. Res. II Enc. Nac. Agric. Org., p. 13, La Habana.
172. Ortiz, S. 2001. Estudio de las condiciones de crecimiento de *B. cepacia* 0057 para la producción de sideróforos. Tesis de Maestría en Ciencias. INCA, La Habana.
173. Palm, C.A and Sánchez, P.A. 1990. Decomposition and nutrient release patterns of the leaves of tree tropical legumes. **Biotropic**, 22:330-338.
174. Pandey, A., Sharma, E. and Palni, L.M. 1998. Influence of bacterial inoculation on maize in upland systems of the Sikkim Himalaya. **Soil Biol. Biochem.**, 30: 75-83.
175. Parke, J.L. and Kaeppler, S.W. 2000. Effects of genetic differences among crop species and cultivars upon the arbuscular mycorrhizal symbiosis. En: Kapulnick, Y. and Douds, D.D. (eds.). Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Kluwer, Dordrecht.
176. Pattinson, G.S. and McGee, P.A. 1997. High densities of arbuscular mycorrhizal fungi maintained during long fallow in soils used to grow cotton except when soil is wetted periodically. **New Phytol.**, 136: 571-580
177. Pazos, M. y Hernández, A. 1999. Aislamiento y caracterización de cepas de *Azospirillum brasilense*, asociadas al cultivo del arroz. **Cult. Trop.** (Cuba), 22 (1): 6-8.
178. Pérez, N., Del Pozo, E. y Montano, R. 1995. Las plagas. ¿Un mal de la naturaleza o un manejo inadecuado de la agricultura?. **Agric. Org.** (Cuba), 1 (2): 11-15.
179. Phillips, D.M y Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 55: 158-161.

180. Pijeira, L., Cuba, M., Corbera, J., Martínez, M. y Soría, E. 1996. El uso de Biofert-Bol (inoculante micorrizógeno) en diferentes especies cultivadas de Bolivia. Mem. XVIII Reunión Latinoam. Rhizobiología, p. 395-396, Santa Cruz de la Sierra.
181. Plazinski, J. and Rolfe, B.G. 1991. Influence of *Azospirillum* strains on the nodulation of clovers by *Rhizobium* strains. **Appl. Environ. Microb.**, 49: 984-989.
182. Pohlan, J., Borgman, J. y Leyva, A. 1995. Bainoa: un ejemplo para programas regionales de la agricultura sostenible en Centro América. Verlag-Shaker, Leipzig.
183. Poulton J.L., Bryla, D., Koide, R.T. and Stephenson, G. 2002. Mycorrhizal infection and high soil phosphorus improve vegetative growth and the female and male functions in tomato. **New Phytol.**, 154 (1): 255-267.
184. Primavesi, A. 1990. Manejo ecológico do solo. Agricultura em regioes tropicais, Sao Paulo.
185. Purcino, A.A., Paiva, E., Silva, M.R. and Andrade, S.R. 1996. Influence of the inoculation with *Azospirillum* sp in nitrogen and carbon fixation in yield seed and assimilation nitrogen enzymes in maize. **J. Plant Nut.**, 19 (7): 1045-1060.
186. Randrianjafy, R. 1994. El girasol (*Helianthus annus* L.), su fenología e importancia económica. Trabajo de Diploma. ISCAH, La Habana .
187. Rattan A., Chauhan, S.P. and Adholeya, A. 2001. Dependence of sunflower (*Helianthus annus* L.) on VA mycorrhizal consortium in a sewage-sludge ammended wasteland soil. Disponible en [http:// www-icom.slu.se/abstract.html](http://www-icom.slu.se/abstract.html). Rev: 02/06/02.
188. Reynaldo, I., Llonin, D. y Medina, N. 2000. Influencia de la micorrización sobre la utilización del nitrógeno en plantas de tomate (*Lycopersicon sculentum*). Prog. y Res. XII Sem. Científ., p. 110. INCA, La Habana
189. Rillig, M. and Wright, S. 2000. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in aggregation. Comparing effects of five plant species. **Plant Soil J.** Disponible en <http://www.nps.usda.gov/publication/publication/htm>. Rev: 04/11/02
190. Rillig, M.C. and Steimberg, T.R. 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? **Soil Biol. Biochem.**, 34: 1371-1374.

191. Rillig, M.C., Allen, M.F. and Field, C.B.; 1999. Soil biota responses to long-term atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment in two California annual grasslands. **Ecol.**, 119: 572-577.
192. Rillig, M.C., Wright, S.F., Nichols, K.A., Schmidt, W.F. and Torn, M.S. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil**, 233: 167-177.
193. Rivera, R. y Fernández, K. 2003. Bases científico-técnicas para el manejo de los sistemas agrícolas micorrizados eficientemente. En: Rivera, R. y Fernández, K. (eds.). El manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe. Ed. INCA, La Habana.
194. Römheld, V. 1998. The importance of rhizosphere processes in the mineral nutrition of rainfed lowland rice. En: Rainfed rowland rice: Advances in nutrient management research.
195. Rosset, P. y Altieri, M. 2001. Agricultura en Cuba: Una experiencia nacional en conversión orgánica. Disponible en <http://www.clades.org/r7-art4.htm>. Rev: 14/05/02.
196. Rousseau, A., Benhamou, N., Chet, I. and Piché, Y. 1996. Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopat.**, 86: 434-443.
197. 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 de Doctorado en Ciencias Agrícolas. INCA, La Habana.
198. Ruíz, R. y Leyva, L. 1997. Influencia del *Bradyrhizobium japonicum* y los fertilizantes minerales en dos variedades de soya cultivadas sobre un suelo pardo grisáceo. Res. IV Cong. Soc. Cub. Ciencia del Suelo, p. 85, Matanzas.
199. Sanchez, P.A., Buresh, R.J. and Leakey, R.B. 1997. Tree, soil and food security. **Philos. Trans. R. Soc. London**, Serie B.352.
200. Sanders, I.R. and Fitter, A.H. 1992. The ecology and functioning of vesicular–arbuscular mycorrhizas in co-existing grassland species. II. Nutrient uptake and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants in a semi-natural grassland. **New Phytol.**, 120: 525-533.

201. Sanginga, N., Carsky, R.J. and Dashiell, K. 1999. Arbuscular mycorrhizal fungi respond to rhizobial inoculation and cropping systems in farmers' fields in the Guinea savanna. **Biol. Fert. Soils**. 30 (3):179-186.
202. Scherr, S.J. y Yadav, S. 1998. Degradación de tierras en el mundo en desarrollo. Asuntos de interés y opciones de política para el año 2020. Disponible en <http://www.ifpri.cgiar.org/spanish/2020/briefs.htm>. Rev: 20/05/03.
203. Schmidt, W., Oma, H. and Martín, P. 1988. *Azospirillum brasilense* produces AIA and increase nodulation of legumes. En: Legumes nitrogen fixation, New York.
204. Schomberg, H.H., Steiner, J.L. and Unger, P.W. 1994. Decomposition and nitrogen dynamics of crop residues. Residue quality and water effects. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, 58: 372-381.
205. Secilia, L. and Bagyoraj, W. (1987). Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizal. **Can. J. Microb.**, 33: 1069-1073.
206. Shepherd, M. and Harrison, R. 2000. Understanding soil fertility is organically farmed soil. Disponible en <http://www.adas.co.uk>. Rev: 20/03/02.
207. Shreiner, P. and Jastrow, J.D. 1995. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. En: Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA Spec. Pub. 54, Madison.
208. Shreiner, R.P, Mighara, K.L., McDaniel, H. and Bethlenfalvay, G.J. 1997. Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. **Plant and Soil**, 188: 199–209.
209. Sieverding, E and Toro, S. 1988. Influence of soil water regimes on VA mycorrhiza. V. Performance of different VAM fungal species with cassava. **J. Agron. Crop Sci.**, 161: 322-332.
210. Sieverding, E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizal in tropical agrosystems. GTZ, Munich.
211. Simard, S.W., Perry, D.A., Jones, M.D., Myrold, D.D., Durall, D.M. and Molina, R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. **Nature**, 388: 579-582.
212. Simpson, D. and Daft, M..J. 1990. Spore production and mycorrhizal development in various tropical crop hosts infected with *Glomus clarum*. **Plant and Soil**, 121:171-178.

213. Siqueira, J.O y Franco, A. 1988. Biotecnología do solo. Fundamentos e perspectivas. Ciências nos Tropicós Brasileiros. Serie Agronomía.
214. Sivila, R. y Hervé, D. 1994. El estado microbiológico del suelo, indicador de la restauración de la fertilidad. En: Hervé, D., Genin, D. y Riviere, G. (eds.). Dinámica del descanso de la tierra en los Andes. IBTA-ORSTOM, La Paz.
215. Smith, S.E. and Read, D.J. (eds.). 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, New York
216. Soderberg, K., Olsson, P.A and Baath, E. 2002. Structure and activity of bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonization. **Microb. Ecol.**, 40: 223-231.
217. Somda, Z.C., Ford, P.B. and Hargrove, W.L. 1991. Decomposition and nitrogen of cover crops and crop residues. En: Hargrove, W.L. (ed.). Cover crops for clean water. Soil & Water Conservation Society, Iowa.
218. Stancheva, I. 1998. Improvement of the nitrogen uptake and nitrogen content in maize (*Zea mays* L.) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Agrochim.**, 30 (5-6): 299-306.
219. Stuart, B. and Howard, C. 2001. Crop nutrition in Central Queens land. Disponible en <http://www.dpi.qld.gov.au/fieldcrops/3160htm>. Rev: 19/3/01.
220. Terry, E. y Pino, M.A. 2002. Biofertilizantes. Una alternativa promisorio para incrementar la productividad y calidad del cultivo del tomate. Prog. Res. XIII Cong. Científ., p. 112. INCA, La Habana.
221. Terry, E., Pino, M.A y Medina, N. 1998. Uso y manejo de biofertilizantes en el cultivo del tomate. Prog. Res. XI Sem. Científ., p. 35. INCA, La Habana.
222. Thompson, B.D., Robson, A.D. and Abbott, L.K. 1991. Soil mediated effects of phosphorus supply on the formation of mycorrhizas by *Scutellospora calospora* (Nicol. and Gerd.) Walker and Sanders on subterranean clover. **New Phytol.** 118: 463-469.
223. Thompson, J.P. 1994. Inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from cropped soil overcomes long-fallow disorder of linseed (*Linum usitatissimum* L.) by improving P and Zn uptake. **Soil Biol. Biochem.**, 26: 1133-1143.
224. Toro, M., Azcon, R. and Herrera, R. 1996. Effects on yield and nutrition of mycorrhizae and nodulate *Pueraria phaceoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. **Biol. Fert. Soils**, 21 (3): 325-328.

225. Trouvelot, A., Kough, J. et Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Proc. 1st Eur. Symp. on Mycorrhizae: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae, Dijón. INRA, Paris.
226. Valentine, A.J., Osborne, B.A. and Mitchell, D.T. 2002. Form of inorganic nitrogen influences mycorrhizal colonization and photosynthesis of cucumber. **Sci. Hort.**, 92 (3-4): 229-239.
227. Vande Broek, A. and Vanderleyden, J. 1995. Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Plant Sci.**, 14 (5): 445-446.
228. Velasco, J., Ferrera-Cerrato, R. y Almaraz J.J. 2002. Vermicomposta, micorriza arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate. **Terra**, 19: 241-248.
229. Velazco, A.C. 1997. *Azospirillum* sp como diazotrófico predominante en los cultivos de caña de azúcar y arroz. Tesis de Maestría en Ciencias. Fac. Biología, Univ. de la Habana.
230. Vivekanandan, M. and Fixen, P.E. 1991. Cropping systems effects on mycorrhizal colonization, early growth, phosphorus uptake of maize . **Soil. Sci. Soc. Am. J.**, 55: 136-140.
231. Walker, T.L., Safir, G.R. and Stephenson, S. 1990. Evidence for succession of mycorrhizal fungi in Michigan asparagus fields. **Act. Hort.**, 271: 273-279.
232. Woodard, H.J. and Bly, A. 2000. Maize growth and yield responses to seed-inoculated N<sub>2</sub> fixing bacteria under dryland production conditions. **J. Plant Nut.**, 23 (1): 55-65.
233. Wright S.F. and Anderson, R.L. 2000. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central Great Plains. **Biol. Fert. Soils**, 31 (3/4): 249-253.
234. Wright, S. 2000. A pressure cooker method to extract glomalin from soils. **Soil Sci. Soc. Am. J.** Disponible en <http://www.nps.usda.gov/publication/htm>. Rev: 08/
235. Wright, S., Nichols, K., Jawson, L., McKenna, L. and Almendras, A. 2001. Glomalin. A manageable soil glue. **Soil Sci. Soc. Am. Spec. Pub.** Disponible en <http://www.nps.usda.gov/publication/htm>. Rev: 07/08/02

236. Wright, S.F. and Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphen of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, 198: 97-107.
237. Wright, S.F., Starr, J.L. and Paltineanu, I.C. 1999. Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, 63 (6): 1825-1829.
238. Zak, D.R., Gerigal, D.F., Gleeson, S. and Tilman, D. 1990. Carbon and nitrogen cycling during old field succession. Constraint on plant and microbial biomass. **Biogeochem.**, 11: 111-129.
239. Zhang, F., Hanel, C., Kianmehr, H. and Smith, D.L. 1995. Root-zone temperature and soybean (*Glycine max. (L) Merr*) vesicular arbuscular mycorrhizal. Development and interaction with the nitrogen fixing symbiosis. **Environ. Exp. Bot.**, 35 (3): 287-298.

## Anexo

**Tabla A-1. Efecto de la frecuencia de inoculación sobre el comportamiento de las variables asociadas al tamaño de las partículas del suelo durante el primer año de estudios.**

Tratamientos	> 1 mm (ts)	> 2 mm (ts)	1-0,5 mm (th)	0,5-0,25 mm (th)	>0,25 mm (th)
S1 F0	13,5 fgh	41,5 abc	22,9 ef	9,3 e	52,7 a
S1 F1	8,5 hi	34,7 bcde	25,6 cde	10,1 de	52,2 a
S1 F2	6,3 i	31,5 cde	30,9 bcd	12,8 abcde	46,2 abcd
S1 F3	6,2 i	26,6 e	32,6 abc	13,6 abcd	41,1 bcde
S2 F0	12,7 gh	38,0 abcd	26,8 cde	10,9 cde	50,5 ab
S2 F1	9,4 hi	32,4 cde	27,6 cde	11,6 bcde	46,5 abc
S2 F2	5,6 i	29,6 de	36,0 ab	16,5 ab	35,5 ef
S2 F3	5,4 i	29,2 de	38,2 ab	18,2 ab	32,1 ef
S3 F0	23,0 ab	35,4 bcde	17,9 f	10,1 de	54,0 a
S3 F1	21,3 bc	47,5 a	25,5 cdef	9,9 e	47,8 abc
S3 F2	15,9 def	43,6 ab	26,0 cde	14,2 abcd	38,3 cdef
S3 F3	15,8 def	47,9 a	32,5 abc	15,3 abcd	31,4 ef
S4 F0	27,5 a	40,5 abc	23,9 def	9,1 e	35,7 def
S4 F1	19,2 bcd	43,6 ab	31,9 abc	11,5 bcde	37,3 cdef
S4 F2	17,5 cde	38,9 abcd	37,0 ab	18,5 a	29,1 f
S4 F3	16,6 cdef	35,6 bcde	38,7 a	16,7 ab	30,6 ef
ESx	1,0**	1,6**	1,3**	0,9**	1,8**

ts = tamiz seco; th = tamiz húmedo

**Tabla A-2. Efecto de la frecuencia de inoculación sobre el comportamiento de las variables asociadas al tamaño de las partículas del suelo durante el segundo año de estudios.**

Tratamientos	> 1 mm (ts)	> 2 mm (ts)	1-0,5 mm (th)	0,5-0,25 mm (th)	> 0,25 mm (th)
S1 F0	16,8 de	37,8 bcd	24,5 hi	9,7 ef	50,8 ab
S1 F1	10,9 ef	31,1 de	25,2 ghi	9,4 ef	51,4 a
S1 F2	7,4 f	30,9 de	29,8 defg	13,2 abcde	45,0 abc
S1 F3	7,6 f	26,2 e	31,7 bcd	13,8 abcd	44,4 bc
S2 F0	11,4 e	41,4 abc	27,8 efgh	11,7 cdef	45,2 abc
S2 F1	11,3 ef	33,4 cde	27,2 efghi	11,4 cdef	44,3 bc
S2 F2	7,8 f	30,6 de	33,2 cd	16,2 ab	34,1 efg
S2 F3	6,4 f	29,4 de	36,0 ab	17,0 a	32,0 g
S3 F0	25,4 ab	35,5 cde	18,4 j	8,6 f	48,1 ab
S3 F1	23,7 bc	43,7 ab	22,6 ij	7,9 f	50,7 ab
S3 F2	17,4cde	44,3 ab	26,4 fgghi	10,3 cdef	41,0 cd
S3 F3	17,6 de	48,4 a	28,7 efgh	14,0 abcd	32,7 fg
S4 F0	30,2 a	38,6 abcd	24,6 hi	9,9 def	38,9 cdef
S4 F1	22,9 bcd	41,6 abc	31,0 cdef	10,4 cdef	40,8 cde
S4 F2	21,5bcd	35,5 bcde	34,8 abc	11,7 cdef	36,0 cdg
S4 F3	18,3 cd	32,6 cde	39,3 a	13,0 bcde	31,1 g
ESx	1,1**	1,7**	0,8**	0,7**	1,1**

ts = tamiz seco; th = tamiz húmedo