



*Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*



Coinoculación de rizobios y hongos micorrízicos arbusculares para el establecimiento de *Stylosanthes guianensis* en asociación con *Brachiaria decumbens*

*Tesis presentada en opción al título académico de Maestro en Ciencias en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes*

**Autor:** *Ing. Gustavo Crespo Flores*

**Tutor:** *Dr. C. Pedro José González Cañizares*

*San José de las Lajas, Mayabeque*  
*2016*

# *Dedicatoria*

*A mis padres*

*A mis hijos*

*y*

*A mi esposa*

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Revolución Cubana, por posibilitar mis estudios y mi formación profesional.
- A mi padre y mi madre, por guiarme con la luz de su ejemplo, en el trabajo y conducta en general, por su apoyo constante y la confianza depositada en mí.
- A mi esposa, por su apoyo diario y a mis tres hijos (Thalía, Danny Y. y Dariel G.), por ser mi principal motivación para seguir adelante.
- A toda mi familia, desde el más pequeño hasta el más longevo, los que están lejos y los de cerca, y con los que convivo diariamente.
- A mi tutor, Dr. C. Pedro José González, por su constante apoyo en el desarrollo de este trabajo y mi trayectoria profesional en estos últimos años.
- A aquellos a los que considero verdaderos maestros de la enseñanza profesional, quienes me han guiado de alguna manera para desarrollar este trabajo, los Dr. C. Rodolfo Plana, Nicolás Medina, Alberto Hernández, entre otros y los Ms. C. Jorge Corbera, Luis R. Fundora y Alfredo Calderón.
- A los miembros de la Comisión Científica del departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas por sus consejos y sugerencias, especialmente a mi oponente Dr. C. Eduardo Pérez, por su excelente revisión del documento.
- A todos los profesores y compañeros de clase de la maestría.
- A todos los integrantes de mi especial colectivo del Grupo de micorrizas, los presentes y los que ya no están, por su apoyo, conocimientos compartidos y por su amistad.
- A los colegas Belkis, Ionel y Pedro, por su ayuda y buena disposición.
- A los técnicos y demás personal del departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las plantas, que de alguna manera me ayudaron en los muestreos y otras labores, Herminio, Reynerio, Javier (el pitufo), Ilda, Kirenia, Walkiria, Tomás y su equipo de trabajo, la informática (Yanitsa) del departamento, etc.
- A Juan Ramírez y su equipo de trabajo en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Cascajal, por su apoyo brindado en la ejecución de los experimentos.
- A todo el que en algún momento se interesó en el progreso de este trabajo.

Sinceramente, gracias a todos

## Síntesis

Se realizaron dos experimentos con el objetivo de determinar la efectividad de la coinoculación de rizobios y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para el establecimiento de *S. guianensis* en un pastizal de *B. decumbens*. En el primero se evaluaron los aislados de rizobios Sty-1, Sty-2 y Sty-3, solos y combinados con *Funneliformis mosseae*, más un testigo sin inocular y el HMA solamente; en el segundo se incluyeron cuatro tratamientos conformados por brachiaria en monocultivo, estilósante asociado con brachiaria y estilósante asociado con brachiaria más la coinoculación de *F. mosseae* y los aislados de rizobios más efectivos, según los resultados del experimento anterior. En ambos experimentos se utilizó un diseño de bloques al azar con cuatro y cinco réplicas respectivamente. La inoculación conjunta de *F. mosseae* y los aislados de rizobio Sty-2 y Sty-3 fueron las más efectivas para mejorar la nodulación e incrementar las variables fúngicas, el rendimiento y el estado nutricional de *S. guianensis*. La coinoculación de Sty-2 o Sty-3 con *F. mosseae* aumentó la presencia de la leguminosa asociada con *B. decumbens* y favoreció el rendimiento y el valor nutritivo del pastizal.

## Listado de siglas y abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
AOAC	Official Methods And Analysis
°C	Grados Celsius
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CCB	Capacidad de intercambio de bases
cmol.	Centimol
CPU	Peso cubano \$
cv.	Cultivar
DMO	Digestibilidad de la materia orgánica
EE	Error estándar
EM	Energía metabolizable
esp.	Esporas
FAD	Fibra ácido detergente
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FBN	Fijación biológica del nitrógeno
FND	Fibra neutro detergente
g	Gramos
ha	Hectáreas
HMA	Hongos micorrizícos arbusculares
I	Inoculado
IC	Intervalo de confianza
ICA	Instituto de Ciencia Animal
INCA	Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
Kg	Kilogramos
MINAG	Ministerio de la Agricultura (República de Cuba)
ml	Mililitros
MO	Materia orgánica
MS	Masa seca
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MV	Masa verde
NI	No inoculado
PB	Proteína bruta
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
t	Toneladas
UFC	Unidades formadoras de colonias

## ÍNDICE

	Pág.	
I	Introducción	1
II	Revisión bibliográfica	4
2.1	Características generales de <i>Brachiaria decumbens</i> y <i>Stylosanthes guianensis</i>	4
2.1.1	<i>Brachiaria decumbens</i>	4
2.1.2	Características botánicas de la especie	4
2.1.3	<i>Stylosanthes guianensis</i>	5
2.1.4	Características botánicas de la especie	6
2.2	Exigencias climáticas y edafológicas	7
2.2.1	<i>Brachiaria decumbens</i>	7
2.2.2	<i>Stylosanthes guianensis</i>	7
2.3	Requerimientos nutricionales	8
2.3.1	<i>B. decumbens</i>	8
2.3.2	<i>S. guianensis</i>	10
2.4	Valor nutritivo	12
2.4.1	<i>B. decumbens</i>	12
2.4.2	<i>S. guianensis</i>	12
2.5	Producción de biomasa	13
2.6	Asociaciones leguminosas-gramíneas	15
2.6.1	Beneficios de la introducción de leguminosas en el sistema	17
2.6.2	Factores que dificultan el éxito de asociaciones gramíneas-leguminosas	19
2.7	Fijación biológica del N en leguminosas	21
2.8	Hongos micorrízicos arbusculares	22
2.8.1	Importancia de los HMA en la nutrición de las plantas	24
2.8.2	Micorrizas en agroecosistemas de pastizales	25
2.9	Interacción HMA - rizobios	26
2.10	Perspectiva del manejo de biofertilizantes en los agroecosistemas de pastizales	27
III	Materiales y Métodos generales	29
3.1	Condiciones experimentales	29
3.1.1	Clima y suelo	29
3.1.2	Material vegetal	30
3.2	Descripción de los experimentos	30
3.2.1	Experimento 1. Coinoculación de aislados de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular en <i>Stylosanthes guianensis</i>	30
3.2.2	Experimento 2. Establecimiento de <i>Stylosanthes guianensis</i> vc. CIAT-184 coinoculado con rizobios y <i>F. mosseae</i> en un pastizal de <i>Brachiaria decumbens</i>	32
3.3	Procedimiento general y determinaciones realizadas	33

## Continuación

3.3.1	Muestreos y análisis de suelos	33
3.3.2	Métodos de inoculación de los biofertilizantes empleados	33
3.3.3	Composición botánica del pastizal	34
3.3.4	Rendimiento de masa seca	34
3.3.5	Concentraciones de nutrientes	35
3.3.6	Variables fúngicas	35
3.3.7	Conteo y determinación de la eficiencia de los nódulos de rizobios	36
3.4	Análisis estadístico	36
3.5	Valoración económica	37
IV	Resultados y discusión	38
4.1	Experimento 1: Coinoculación de aislados de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular en <i>Stylosanthes guianensis</i>	38
4.1.1	Variables fúngicas del estilosante	38
4.1.2	Efectividad de la nodulación del estilosante	39
4.1.3	Efecto de los tratamientos en las concentraciones de N, P y K en la biomasa de la parte aérea del estilosante	41
4.1.4	Efecto de los tratamientos en el rendimiento de MS del estilosante	44
4.2	Experimento 2. Establecimiento de <i>Stylosanthes guianensis</i> vc. CIAT-184 coinoculado con rizobios y <i>F. mosseae</i> en un pastizal de <i>Brachiaria decumbens</i>	46
4.2.1	Influencia de los tratamientos en las variables fúngicas de las plantas que conforman el pastizal y en la nodulación del estilosante	46
4.2.2	Influencia de los tratamientos en las concentraciones de PB, P y K en la biomasa aérea de los pastos	48
4.2.3	Influencia de los tratamientos en los porcentajes de fibra detergente neutra (FND) y la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) del forraje	52
4.2.4	Efecto de los tratamientos en la composición botánica del pastizal	54
4.2.5	Efecto de los tratamientos en el rendimiento de MS de los pastos	56
4.3	Consideraciones económicas sobre la coinoculación de hongos micorrízicos arbusculares y rizobios durante el establecimiento de <i>S. guianensis</i> en un pastizal de <i>B. decumbens</i>	59
4.4	Consideraciones generales sobre la coinoculación de HMA y rizobios eficientes en el establecimiento de <i>Stylosantes guianensis</i>	61
V	Conclusiones	64

## Continuación

VI	Recomendaciones	65
VII	Referencias bibliográficas	66
	Anexos	





*Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*



Coinoculación de rizobios y hongos micorrízicos arbusculares para el establecimiento de *Stylosanthes guianensis* en asociación con *Brachiaria decumbens*

*Tesis presentada en opción al título académico de Maestro en Ciencias en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes*

*Autor: Ing. Gustavo Crespo Flores*

*San José de las Lajas, Mayabeque  
2016*

# INTRODUCCIÓN



## I. Introducción

Uno de los pilares fundamentales en la producción bovina en condiciones tropicales en los países de Latinoamérica y otras regiones, es la alimentación con base en pasturas y otras fuentes forrajeras (Rua, 2008). Para suplir las necesidades alimentarias de los animales basado en este tipo de sistema de producción y obtener suficiente ganancia de peso vivo, se precisa de producciones forrajeras que permitan satisfacer esta demanda.

Por lo general, en las áreas ganaderas de la región existe predominio de pastos naturales e introducidos, en su mayoría gramíneas, siendo el uso de leguminosas forrajeras poco extendido. Esto sucede a pesar de que son conocidas las ventajas nutricionales que destacan a las leguminosas sobre las gramíneas, especialmente en sus contenidos de proteína bruta, minerales y mayor digestibilidad (Crespo, 2009).

Establecer asociaciones de especies de gramíneas con leguminosas forrajeras, sin duda mejora el contenido nutricional del pastizal, constituyendo una alternativa para la sustitución de fertilizantes nitrogenados y la mejoría de la dieta animal (Santos *et al.*, 2011). Sin embargo, las dificultades que usualmente se presentan para lograr establecer y mantener este tipo de asociación (Rojas *et al.*, 2005), son unas de las causas fundamentales de que la mayoría de los productores no apuesten por esta variante.

Las leguminosas requieren un adecuado suministro de nutrientes para garantizar su correcto establecimiento, sobre todo cuando estas se cultivan en asociación con gramíneas (Urbano *et al.*, 2005). Ello encarece la introducción de dichas especies en estos sistemas, lo que sin dudas influye negativamente en la decisión de los ganaderos para utilizarlas.

Por otro lado, de los 2.0 millones de hectareas de los suelos dedicados a la producción ganadera en Cuba (MINAG, 2005), el 75% presenta factores limitantes para la producción de pastos, según la información disponible sobre los estudios de suelo de estas áreas. El último mapeo agroquímico efectuado indicó que alrededor del 50 y el 55% de estos suelos presentan muy bajos niveles de P y K asimilables respectivamente, y la tendencia a la acidificación es evidente (Crespo, 2001).

Aunque desde los inicios de la ganadería en nuestro país se concibieron a las gramíneas y leguminosas como las familias con mayor potencial como fuente de alimentación del ganado para los sistemas de producción de leche y carne, el monocultivo de gramíneas, fundamentalmente de los géneros *Digitaria*, *Pennisetum*, *Megathyrsus* y *Cynodon*, entre otros, se estableció en todas las áreas ganaderas del país, mientras que la utilización de las leguminosas, por diversas causas, no se logró generalizar en los distintos sistemas de producción (Ruíz *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta esta problemática, además de la creciente demanda de tecnologías menos agresivas al medio ambiente, se avizora la necesidad de enfocarse en la búsqueda de nuevos modelos agrícolas, basados en el manejo eficiente de los procesos biológicos que tienen lugar en el sistema suelo-pasto-animal y en el máximo aprovechamiento de los recursos locales, para lograr la sustentabilidad de la producción ganadera (Martha Jr. *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista agronómico, la fijación biológica del nitrógeno a través de la simbiosis rizobio-leguminosa constituye un recurso renovable que puede tener implicaciones económicas y ambientales directas, debido a la disminución de las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados (Martínez Viera y Dibut, 2012). De hecho, el uso de inoculantes a base de rizobios es una herramienta biotecnológica importante para estimular la capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico en las leguminosas; y en el caso de las forrajeras, puede contribuir de forma significativa a aumentar su potencial productivo y al mejoramiento del balance de ese nutriente en los pastizales (Carvalho y Pires, 2008).

Por su parte, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son componentes integrales de la rizosfera de estos cultivos, en los cuales cumplen importantes beneficios relacionados con la mejora de la capacidad de absorción de los nutrientes y el agua (Zhang *et al.*, 2012); de hecho, cuando las comunidades residentes de HMA han sido insuficientes para establecer una asociación efectiva con los pastos, la introducción de cepas eficientes en promover su crecimiento ha reportado considerables beneficios (Carneiro *et al.*, 2011; González, *et al.*, 2015).

En las leguminosas forrajeras, si bien existe información sobre el uso de bacterias nitro fijadoras y HMA por separado, los efectos combinados de ambos microorganismos han sido menos estudiados. No obstante, los resultados de

investigaciones con el empleo de coinoculaciones han demostrado que los beneficios de la simbiosis tripartita leguminosa-rizobio-HMA tributan a la mejora de su estado nutricional y rendimiento, y a la conservación de la fertilidad de los suelos (Toro *et al.* 2008 y González *et al.*, 2015).

A partir de estos criterios se propone el siguiente **problema científico**:

¿Cómo mejorar la introducción de leguminosas en pastizales establecidos de gramíneas?

A partir de este problema se planteó la siguiente **hipótesis**:

La inoculación conjunta de aislados efectivos de rizobios y cepas eficientes de HMA en leguminosas forrajeras mejora su establecimiento en pastizales de gramíneas.

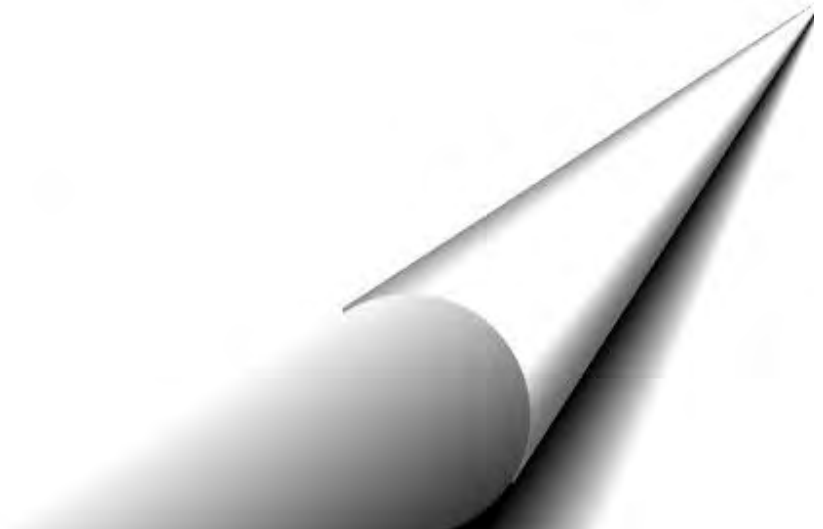
**Objetivo general:**

Determinar la efectividad de la coinoculación de rizobios y hongos micorrízicos arbusculares para el establecimiento de *S. guianensis* en un pastizal de *B. decumbens*.

**Objetivos específicos:**

- 1. Seleccionar aislados de rizobios efectivos y determinar el efecto de su coinoculación con la especie de HMA *Funneliformis mosseae* en *S. guianensis*.
- 2. Evaluar la contribución de la coinoculación de ambos microorganismos rizosféricos al establecimiento de *S. guianensis* en asociación con *B. decumbens*, y en la composición botánica, el rendimiento, y el valor nutritivo del pastizal.

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características generales de *Brachiaria decumbens* y *Stylosanthes guianensis*

#### 2.1.1 *Brachiaria decumbens*

La especie *B. decumbens* es originaria de África Ecuatorial (Anon, 1986). Giraldo *et al.*, (1998) indicaron que se encuentra entre las especies más cultivadas en los sistemas de producción ganadera en el trópico bajo. Se adapta a distintas condiciones agroecológicas hasta 2 200 msnm. Como las demás especies del género *Brachiaria* se caracteriza por ser una planta herbácea que crece de forma natural en sabanas abiertas o con presencia de arbustivas. Esta especie se destaca por su potencial para alcanzar un elevado rendimiento de materia seca, su tolerancia a la baja fertilidad de los suelos y por su agresividad (Bomfim *et al.*, 2003).

Ubicación taxonómica de *Brachiaria ssp.*, según Catasús, (1997).

Reino: Cormobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Commelinidae

Orden: Poales

Familia: *Poaceae*

Subfamilia: *Panicoideae*

Tribu: *Paniceae*

Este género fue reclasificado recientemente, identificándose esta especie ahora como *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster (Cook y Schultze-Kraft, 2015)

#### 2.1.2 Características botánicas de la especie

Las plantas de esta especie son de crecimiento rastrero, con estolones largos, cuyos nudos, al estar en contacto con el suelo, emiten raicillas que dan origen a una nueva planta. Los tallos del género *Brachiaria* son herbáceos, postrados,

semierectos y frondosos, que forman una buena cobertura; la altura entre 50 y 70 cm. Posee una panícula de 11 - 24 cm de largo, que presenta pocos (a veces uno solo) a diversos racimos con espiguillos sésiles o subsésiles, desprovistos de pedicelos, arraigadas en dos filas y en un raquis usualmente achatado, sus hojas son lanceoladas de color verde brillante de 15 - 20 cm de largo y 8-10 mm de ancho. Las semillas son de tamaño medio, algo redondeadas y fértiles (Gutiérrez *et al.*, 1990 y Olivares *et al.*, 2006).

### **2.1.3 *Stylosanthes guianensis***

El género *Stylosanthes* Sw. (*Fabaceae*) es uno de los más importantes entre las leguminosas forrajeras tropicales y sobre él se han hecho numerosas investigaciones (Stace and Edye, 1984). Este género incluye aproximadamente 50 especies y subespecies, predominantemente herbáceas, de regiones tropicales y subtropicales tanto de Asia, África y las Américas, principalmente América del Sur (Quecini *et al.*, 2002), considerándose a Brasil como el centro más importante de diversificación de estas especies (Ferreira y Costa, 1979 y Miles y Lascano, 1997). Las especies de este género son ampliamente utilizadas en la agricultura tropical y subtropical como bancos de proteínas, abono verde y, fundamentalmente, como cultivos forrajeros en asociaciones con gramíneas (Lovato y Martins, 1997). La especie de más amplia distribución es *S. guianensis*, que abarca desde México hasta la Argentina (Williams *et al.*, 1984 y Costa, 2006).

Los parámetros de calidad de la especie *S. guianensis* (Aubl.) Sw. son superiores a otras del mismo género (Ej.: *S. scabra* Vogel y *S. macrocephala* (Ferreira y Costa, 1979; CIAT, 1988). *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, liberado en 1975 como cultivar Pucallpa por el IVITA (Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura) y el INIPA (Instituto Nacional de Investigación y Promoción Agropecuaria) en Perú (Amezquita *et al.*, 1991), es oriundo de América del Sur, pero actualmente se encuentra distribuido en muchos países del mundo.

En la década del 80 fue introducido en Cuba en la zona central de la provincia de Matanzas con resultados satisfactorios, adaptándose rápidamente como cultivar predominante según refieren Mesa *et al.*, (1993), por lo que se ha ido extendiendo su explotación hacia el Occidente del país como se refleja en las evaluaciones de Crespo y Curbelo (1990) y Crespo, Ruiz y Febles (1995).



Ubicación taxonómica de *Stylosanthes guianensis* según SIB (2015):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: *Fabaceae*

Subfamilia: *Faboideae*

Género: *Stylosanthes*

Especie: *Stylosanthes guianensis*

#### **2.1.4 Características botánicas de la especie**

Las plantas de esta especie son decumbentes, con raicillas en los primeros nudos, tallos esponjosos, pubescente con el envés de color verde más claro, estípulas soldadas formando un tubo con pelos glandulares, flores con 6 mm en glomérulos apicales, que maduran de una en una, estandarte amarillo con rayitas rojo pardas en el interior, alas con apéndice de 1mm, estambres monadelfos y vainas de una sola semilla incluida en el cáliz. Una planta típica tiene una forma radial de crecimiento, con ramas finas, flexibles y postradas, que parten del eje central profundamente enraizado. De las ramas radiales con hojas más frondosas crecen los brotes, que se sostienen erectos hasta una altura de un metro, cayendo después sobre sí mismo debido al peso, formando una maraña de tallos lignificados de la cual crecen nuevos tallos erectos. Las hojas trifoliadas la conforman hojitas de 15 a 55 mm de longitud. Aunque la raíz principal penetra hasta un metro en el suelo, alrededor del 80% de las raíces secundarias se presentan en los primeros 20 cm. La forma típica de crecimiento de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. es erecta, aunque también puede crecer postrado y semitrepador (Machado y Chao, 1980).

## **2.2 Exigencias climáticas y edafológicas**

### **2.2.1 *Brachiaria decumbens***

Esta especie se desarrolla con mayor potencial en las zonas tropicales, aunque también se establece en clima moderadamente húmedo, pero no soporta inundaciones prolongadas. Resiste muy bien los períodos de sequía (Vega, *et al.*, 2006), lo que le permite establecerse en regiones tropicales donde predominen períodos secos de cuatro a cinco meses. Su mayor producción de biomasa se obtiene en períodos lluviosos con días cálidos.

Esta gramínea puede desarrollarse en suelos fértiles, ácidos (pH~4,2), así como, en los que son calcáreos y pedregosos con pH~8.5. Alcanza un aceptable crecimiento en zonas con altitudes entre 400 y 1800 msnm, y precipitaciones de 1000 a 3500 mm/año y temperaturas superiores a los 19 °C (Ramírez *et al.*, 2012).

En nuestro país, los estudios han evidenciado sus características promisorias, obteniéndose buena adaptación con altos rendimientos en suelos de pH ácido y poco fértiles, pero con buen drenaje interno y externo (Olivera *et al.*, 2006).

### **2.2.2 *Stylosanthes guianensis***

*S. guianensis* se adapta bien a diferentes tipos de suelos, pero se desarrollan bien cuando estos son poco profundos y moderadamente arcillosos, de pH ácido y de baja fertilidad. Aparece mayormente distribuida en regiones que presentan estas características, probablemente a su mejor competitividad con otras especies que requieren condiciones más favorables para su buen desarrollo.

Su persistencia en el pastizal depende en gran medida del manejo (carga y frecuencia de pastoreo, condiciones del suelo y competencia por agua, sombra y nutrientes) con otras especies asociadas (Aroeira *et al.*, 2005).

Las especies del género *Stylosantes* se enmarcan entre las leguminosas forrajeras más importantes en ambientes tropicales áridos y semiáridos (Guodao *et al.*, 1997) y son resistentes a sequía y tolerantes a bajas temperaturas invernales (t Mannelje, 1977). Pueden tolerar determinados períodos de inundaciones (Amezquita *et al.*, 1991). La especie *Stylosanthes guianensis* se desarrolla bien dentro de un rango de precipitación de 900 - 1800 mm y se adapta mejor en altitudes, que oscilan desde cerca del nivel del mar hasta los 1400 m (Costa y Schultze - Kraft, 1993). El rango de temperatura que permite alcanzar el

mayor crecimiento y el mayor rendimiento en materia seca, se encuentra entre 23 - 29 °C, y la temperatura óptima para una nodulación eficiente es 27 °C (CIAT, 1993).

## **2.3 Requerimientos nutricionales**

### **2.3.1 *B. decumbens***

La explotación de los pastos y forrajes tiene como finalidad la producción intensiva del sistema aéreo (que incluye hojas, tallos y ramas tiernas), de modo que los nutrientes que se requieren para producir óptimos rendimientos varían cuantitativamente de los requeridos por otras especies, en las que lo fundamental es la producción de granos y frutos. La explotación intensiva del forraje es muy exigente en lo que se refiere a la fertilidad del suelo. En las condiciones de pastoreo, gran parte de los elementos nutritivos que consume el ganado vuelve al medio con las deyecciones y la orina (Martines y Fonseca, 1998).

Según Cabalceta (1999), el elemento Nitrógeno es el principal nutriente para mantener la productividad de las gramíneas forrajeras. Este puede limitar el crecimiento y rendimiento del cultivo en caso de encontrarse deficiente, además, su limitación puede influir en los requerimientos de otros nutrientes como el fósforo y el potasio, sobre todo después de su establecimiento. En este sentido, si el N es suficiente en el suelo, ya sea por su aplicación o por encontrarse la gramínea asociada con leguminosas, la respuesta a la aplicación de P, K y, probablemente también al Mg y al S, será mayor, requiriendo así aplicaciones periódicas de mantenimiento. La deficiencia de N es normalmente considerada como la principal causa de la reducción de la productividad y degradación de los pastizales (Fassio *et al.*, 2008). Paretas (1991), afirmó que con riegos periódicos y fertilizantes, fundamentalmente nitrogenados, esta especie produce un alto rendimiento de biomasa que permite intensificar su producción.

Es la gramínea forrajera menos exigente a los macronutrientes N, P y K y a los nutrimentos secundarios (Ca, Mg y S), al compararla con *Panicum maximum* (guinea común) y *Brachiaria brizantha* (Rincón, 1999).

El fósforo, debido a que desempeña un papel directo en el metabolismo vegetal como conductor de energía y constituyente de compuestos orgánicos indispensables para la síntesis de proteínas, grasas y almidón, se considera como un elemento básico para la nutrición de plantas forrajeras (Mesa *et al.*, 1989).

Según Fenster y León (1979), en los suelos ácidos e infértiles de la América latina tropical, el contenido total de fósforo oscila entre 200 y 600 ppm y el fósforo disponible varía entre 1 y 5 ppm, razón por la cual se considera el elemento más limitante para la producción de pastos y forrajes en dicha región (Pérez *et al.*, 2009).

En la fase inicial de crecimiento, los pastos necesitan una mayor disponibilidad de P en la solución del suelo, debido a que su sistema radicular se encuentra explorando un área reducida. Proporcionalmente a su crecimiento, la exigencia de este elemento se torna más elevada en razón a la cantidad de nutrientes que demanda el aumento de la biomasa vegetal. Si existe limitación nutricional, sobre todo de P, en esta fase, el período de establecimiento se prolonga, retardando el inicio de comienzo de pastoreo.

Después del establecimiento, durante la fase productiva, las exigencias de P llegan a ser menores, pues las plantas ya han acumulado nutrientes en sus tejidos y su sistema radicular ya explora mayor volumen de suelo. Adicionalmente, la ocurrencia normal de simbiosis con hongos micorrízicos, aportan sus beneficios en dicha fase debido a la mayor capacidad de las raíces de absorber P y otros nutrientes poco móviles en el suelo como el Zn y el Cu (Marschner y Dell, 1994).

En suelos donde los contenidos de P son bajos, muchas especies forrajeras manifiestan cierta dependencia micorrízica (Pérez *et al.*, 2011). *B. decumbens*, es una de las especies más dependientes, en suelos de fertilidad baja, sobre todo en aquellos con bajo contenido del elemento (Saif, 1987, Kanno *et al.*, 2006 y Crespo-Flores *et al.*, 2010).

El K, al igual que el N, es extraído en grandes cantidades por los pastos, de manera que en condiciones de abundancia en el suelo, las plantas pueden tomarlo en cantidades similares a dicho nutriente. Las plantas pueden hacer “consumo de lujo” cuando el contenido de este en el suelo es abundante. Su deficiencia afecta la respiración, la fotosíntesis y produce una acumulación de azúcares. En las gramíneas la deficiencia de este elemento se presenta inicialmente como una clorosis marginal en las hojas viejas, a las que posteriormente sigue la necrosis. La aparición de estos síntomas indica que el contenido de este elemento en el suelo ya es un factor limitante. El contenido de K en las gramíneas puede oscilar desde 0,5 -2,5 % y depende del contenido asimilable en el suelo y de la especie de pasto (ICA, 1990; Gusmao *et al.*, 2002).

### 2.3.2 *S. guianensis*

*Stylosanthes guianensis* parece ser una de la especies de menores exigencias nutricionales. No obstante, se ha indicado que para su normal desarrollo esta planta requiere un contenido en el suelo entre 2.5 y 5.5 ppm de P (Muller, 1975; Fenster y León, 1986), sin embargo, es generalmente sensible a la deficiencia de este elemento, el cual es considerado como la deficiencia primaria más frecuente para esta especie (Tomei *et al*, 1999), causando retraso en el crecimiento y baja producción de biomasa (Hutasoit, 2012).

Las dosis de fósforo que permiten la mayor producción de *S. guianensis* varían de 25 a 50 kg/ha (Tietzel y Bruce, 1973 (citado por Machado y Chao, 1980); CIAT, 1988). Según el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) se recomienda realizar una fertilización de establecimiento con 22 kg/ha de P y al año siguiente aplicar otros 7 kg/ha para mantenimiento (Toledo, 1982).

En esta especie, como en las demás leguminosas en general, el P es de vital importancia, ya que es altamente requerido por el proceso de fijación biológica del nitrógeno que se establece a través de la simbiosis que realizan estas plantas con bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN), generalmente pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. En este proceso, el consumo energético es considerablemente alto, por lo que el P es empleado para formar moléculas de ATP (adenosin trifosfato); de estas últimas se necesitan aproximadamente 28 como balance final de consumo, necesario para romper el triple enlace de una molécula de dinitrógeno (Taiz y Zenger, 2006).

En leguminosas noduladas un 20 % del P total de la planta se encuentra en los nódulos (Gunawardena *et al.*, 1992). En este sentido la simbiosis tripartita entre leguminosa-rizobios-hongo micorrízico arbuscular puede ser favorable en el terreno práctico para conseguir mayor producción de biomasa, si se tiene en cuenta que los últimos facilitan la llegada de fosfatos de difícil acceso a la raíz, elemento que escasea su disponibilidad en la mayoría de los suelos, hecho que beneficia a toda simbiosis fijadora de nitrógeno (Rodríguez - Barrueco *et al.*, 1985).

Se estima que a través de la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa se fija de 24 a 584 kg.ha<sup>-1</sup> de N al año, siendo esta vía la más elaborada y eficiente entre las plantas y las bacterias (Martínez - Viera y Dibut, 2012), por lo que utilizar cepas de rizobios eficientes resuelve en cierta medida los requerimientos de este nutriente.

No todos los géneros de leguminosas nodulan, sin embargo, en la subfamilia *Papilionoideae*, se dan nódulos en un 95 por ciento de los individuos examinados (Allen and Allen, 1981). El género *Stylosanthes*, presenta cierta especificidad de especies de rizobios para poder establecer una simbiosis efectiva, ya que se pueden encontrar especies con un amplio rango de nodulación efectiva hasta otras con gran especificidad (Date, 1977).

Es importante conocer que la presencia de altos contenidos de nitratos en el suelo, inhiben la fijación simbiótica del nitrógeno (FSN). Altos niveles de nitratos interaccionan con la concentración de oxígeno (Arrese-Igor *et al.*, 1993); (de Lorenzo *et al.*, 1994), lo cual afecta el funcionamiento de la nitrogenasa nodular, enzima protagonista en la reducción del nitrógeno a amoníaco (Iannetta *et al.*, 1995). Además, para la planta, es más económico, en cuestiones energéticas, tomar N del suelo y/o de fertilizante que de la FBN. Por todo esto no se recomienda aplicar fertilizantes nitrogenados cuando se inocula con rizobios, ya que sería un gasto innecesario. Lo más provechoso de esta simbiosis es el ahorro de fertilizantes nitrogenados y el beneficio ecológico que ello representa.

*S. guianensis* es poco exigente de K, siendo muy poco frecuente encontrar síntomas de deficiencia de este elemento en estas plantas.

En sistemas de pastoreo, alrededor del 80% del K que los animales consumen regresa al suelo por medio de las excreciones, fundamentalmente a través de la orina, y constituye un fertilizante potásico efectivo, que está inmediatamente disponible para las plantas (Hutchings *et al.* 2007), por lo que se estima que en estos sistemas donde se encuentre esta especie la necesidad de aplicar potasio es menor.

De forma general, el 75, 80 y 85 % del N, P y K consumido por los rumiantes son excretados por las heces y la orina de estos animales. Por lo tanto, la mayoría de los nutrientes ingeridos se reciclan muchas veces en los ecosistemas de pastizales (Rodríguez *et al.* 2005). Estos nutrientes reciclados sobre el pastizal se pueden convertir en formas asimilables para las plantas. No obstante, estas excreciones se distribuyen de forma poco uniforme en los potreros. Esto provoca que el reciclaje de sus nutrientes sea poco eficiente (Crespo, 2013).

Para evitar la degradación del pastizal, el fósforo debe reponerse al suelo a través de algún portador, anual o bienalmente, ya que es exportado mediante los cortes o pastoreos, pero en menor medida que el K y el N, debido a su menor presencia

en los tejidos foliares. El potasio y el nitrógeno deben reponerse, en el caso de sistema de corte, después de cada cosecha, ya que se encuentran estos nutrientes abundantemente en los tejidos vegetales (Suarez *et al.*, 2001).

## **2.4 Valor nutritivo**

### **2.4.1 *B. decumbens***

La afectación del valor nutritivo de los pastos es provocada por diversos factores, entre ellos se encuentran: etapas de crecimiento, relación hoja-tallo, altura del corte, especies de pastos, edad fisiológica, relación carbono-nitrógeno, humedad del suelo y el efecto del pastoreo.

El valor nutritivo de *B. decumbens* se puede considerar como moderado en términos de su composición química, digestibilidad y consumo. Los contenidos de proteína de este género varían entre 6 y 8 %, de acuerdo con la especie (Arias y Hernández, 2002). Además, Miles (2006) asegura que estos indicadores dependen del manejo integral que reciban.

En un estudio donde se evaluó la composición bromatológica de 24 accesiones de *Brachiaria spp.* (Canchila *et al.*, 2009), los rangos que se obtuvieron en los indicadores nutricionales fueron los siguientes: MS: 23.4 - 25.7 %, Proteína: 6.0 - 7.5 %, grasas: 1.1 - 2.1 %, FAD: 44.0 - 50.5 % y cenizas: 5.5 - 9.0 %. El estudio incluyó accesiones de las especies *B. humidicola*, *B. dictyoneura*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis*, *B. brizantha* y un par de híbridos, resultando los valores de composición bromatológica esperados, teniendo en cuenta que la fertilización aplicada fue baja.

### **2.4.2 *S. guianensis***

Por otra parte, la leguminosa *Stylosanthes guianensis* presenta buen valor nutritivo, en ocasiones mayor que otras especies tropicales (Tomei *et al.*, 1997). Dentro de su mismo género, los parámetros de calidad de esta especie son superiores a otras (CIAT, 1988). Análisis químicos realizados en varias especies de *Stylosanthes*, mostraron que las cifras de proteína bruta oscilan entre 12,1 y 18,1 % en la planta íntegra (Skerman *et al.*, 1991). Según Patiño *et al.* (2013) el contenido de PB varía con la edad y la época o régimen de precipitaciones.

‘t Mannelje y Jones (1992) plantearon que cuando *S. guianensis* crece en suelos pobres puede presentar una concentración de P de 0.06 %, pero fertilizado con este nutriente puede incrementarse hasta más de 0.30 %. También en suelos de

pH ácido y con bajo contenido del elemento, se han obtenido valores entre 0.24 y 0.25 % de P en los tejidos foliares al aplicar HMA y rizobios (Crespo-Flores *et al.*, 2014).

En un estudio realizado por Ciotti *et al.*, (2003) en la región del Nordeste de Argentina, se encontró que en la fase vegetativa, los contenidos de P, K, Ca, Mg y PB, fueron de 0.25, 1.96, 1.13, 7.8 y 15.4 % respectivamente, y en la fase reproductiva de 0.45, 1.02, 1.07, 1.05, 14.7 %.

## **2. 5 Producción de biomasa**

La producción de materia seca en los pastos es muy variable, lo cual se debe a que las condiciones de manejo a que se someten las plantas, la utilización o no de riego y de fertilización, la intensidad de corte o pastoreo, la época del año y la edad del pastizal, entre otros, afectan este indicador (Olivera *et al.*, 2006).

En Cuba, como en otros países de la región del Caribe, las épocas del año se enmarcan como una época lluviosa y otra de escasas precipitaciones. Teniendo en cuenta esto, los estudios se dividen en cada una de estas etapas estableciendo comparaciones entre ellas. Por ejemplo, en un estudio del rendimiento de masa seca (MS) en *Brachiaria decumbens*, realizado en las condiciones del Valle del Cauto, se observó claramente la diferencia del rendimiento de MS de la brachiaria entre las dos épocas del año, variando dentro de un rango de 0.15 hasta 0.42 tMS/ha/corte, superior siempre en la época donde ocurren las mayores precipitaciones, altas temperaturas y días más largos (Vega *et al.*, 2006).

En el género *Stylosantes*, también se produce una marcada diferencia entre estaciones, lo cual se puso de manifiesto en un estudio realizado por Vera *et al.* (1994) al comparar varios indicadores en distintas épocas (período de máxima y de mínima precipitación), entre varias especies de gramíneas y leguminosas. Independientemente de las condiciones edáficas donde se desarrollen los experimentos, esta diferencia de producción siempre va a estar presente entre las dos épocas mencionadas, siendo la luz, la temperatura y la humedad los principales factores que influyen y condicionan su desarrollo vegetativo (Santos Jr. *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2009).

Por lo general, la acumulación de materia seca del pasto decrece a medida que aumenta la frecuencia y la intensidad de defoliación, tanto en especies templadas



como en especies tropicales (Harris, 1978). Esta reducción en materia seca es atribuida a varios factores, como la reducción en la intercepción de luz para la actividad fotosintética, remoción de reservas orgánicas de la planta, reducción en toma de agua y nutrientes por las raíces y daño en los meristemos apicales (Harris, 1978; Cuesta *et al.*, 2003). La mayor o menor influencia de estos factores depende de las condiciones ambientales y las condiciones de pastoreo (Chaparro, 1991).

Cuando los pastos son sometidos a pastoreo, la dinámica de crecimiento no solo depende de las variaciones del clima y el suministro de nutrientes. Al sumarse la actividad de los animales en el pastoreo, se producen numerosas y complejas interacciones, con respuestas morfológicas y fisiológicas variables, en dependencia del hábito de crecimiento de la planta, mecanismos de propagación y persistencia, así como del sistema de manejo empleado en su explotación (Rodríguez y Aviles, 1997).

En pasturas asociadas sometidas a pastoreo intensivo los rebrotes que emergen dependen de la severidad del pastoreo, lo cual se debe, en parte, a que el potencial fotosintético de la pastura depende de la proporción de hojas jóvenes remanentes que quedan en las plantas recién pastoreadas (Palhano *et al.*, 2005). De estas hojas jóvenes depende directamente la velocidad de recuperación de los carbohidratos de reserva y está relacionada con la tasa de fotosíntesis (Adjei *et al.*, 1989).

La radiación solar es uno de los elementos más importantes para la producción de forraje aprovechable, en virtud de que aporta toda la energía requerida para el crecimiento. Lo ideal es retirar los animales del pastizal dejando una proporción tal de hojas jóvenes y activas que permitan la rápida recuperación de la actividad fotosintética, y el movimiento adecuado de carbohidratos de reserva desde la raíz. Para el manejo del crecimiento y la producción de biomasa de los pastos no puede ser ignorada la fertilidad del suelo. Teniendo en cuenta que en nuestro país, los suelos dedicados a la ganadería presentan un potencial productivo por debajo del 50% (Pérez de los Reyes, 2011), se hace más necesario manejar su fertilización, independientemente de los portadores de que se disponga.

En un programa de manejo de pastos, la fertilización es la práctica que produce los mejores resultados, en un corto tiempo, cuando otros factores del suelo no son limitantes para el desarrollo de las plantas. La fertilización adecuada aumenta la

cantidad y calidad del forraje, y por consiguiente se incrementa la capacidad de mantenimiento y la producción por unidad de área. Para obtener una buena respuesta a la fertilización es necesario tener en cuenta varios factores relacionados con el suelo, el clima y la planta. Además, se debe considerar la cantidad y clase de fertilizante, así como la frecuencia, dosis, método y época de su aplicación (Eusse, 1994).

También, el tipo de suelo, su nivel de fertilidad, la temperatura del suelo y del aire; y la cantidad y distribución de las precipitaciones durante la temporada de crecimiento del pasto, son factores que influyen en el éxito de la asimilación de los nutrientes aportados (Campbell, 1972).

## **2.6 Asociaciones leguminosas-gramíneas**

La introducción de leguminosas en pastizales ha sido sugerida como alternativa para suplir o minimizar la deficiencia de nitrógeno en ecosistemas ganaderos, lo cual aumenta la capacidad de soporte, la longevidad, y su productividad (Almeida *et al.*, 2003). Además, Cadisch *et al.* (1994), considera esta práctica como una de las principales herramientas para prevenir la degradación de los pastizales.

El empleo de las leguminosas asociadas con gramíneas puede producir el ahorro de fertilizantes nitrogenados, agua, energía y alimentos concentrados, entre otras ventajas (Ruiz *et al.*, 2001). Sin embargo, la poca persistencia de estas plantas ha limitado su uso en los pastizales (Ríos, 2002 y Ruiz *et al.*, 2001).

Para lograr asociaciones exitosas de leguminosas y gramíneas debe existir necesariamente una interrelación armónica y equilibrada entre dos o más especies de ambos grupos de plantas (Rojas *et al.*, 2005). Sánchez, (1998) plantea que estas asociaciones se pueden realizar con leguminosas nativas, que se encuentran en el pastizal o con especies introducidas y aprobadas.

El establecimiento de una asociación gramínea – leguminosa, requiere de ciertos arreglos de siembra, para evitar los efectos de competencia, que provoquen el dominio o desplazamiento de alguno de los componentes botánicos, lo que aseguraría mantenerla estable en el tiempo y en el espacio en la pradera. Para obtener el máximo beneficio de la asociación, la disponibilidad de la leguminosa debe representar entre el 30 y 40 % de la disponibilidad del pastizal; valores mayores o menores a estos porcentajes, disminuyen la producción de forraje y, por tanto, la producción animal (Rojas *et al.*, 2005).

Según Rosales (2006), a pesar de la gran diversidad de especies vegetales en la zona tropical, los modelos de alimentación animal se han basado principalmente en el uso de muy pocas especies vegetales. Además, es conocido el desbalance de la producción de biomasa en las áreas ganaderas del trópico latinoamericano por la presencia de un período lluvioso y otro período seco, donde solo se produce el 30 % del rendimiento total anual en este último (Crespo *et al.*, 1986).

A pesar de los resultados positivos a nivel experimental, para lograr obtener el potencial productivo de una pradera asociada, en términos de producción de carne y leche por hectárea, en forma sostenible, es necesario aplicar su manejo adecuado (Enríquez *et al.*, 1999). Los sistemas semi-intensivos implican un cierto grado de manejo eficiente del pastoreo, particularmente en lo referente a frecuencia e intensidad. El mantener una leguminosa en una pradera asociada, demanda un nivel más sofisticado de manejo, que el de una gramínea bien adaptada, de modo que las leguminosas pueden desaparecer por un manejo inapropiado (Argel, 1996).

Se conoce también, que de los suelos dedicados a la ganadería en Cuba, el 47 % clasifican como malos (más de 3 - 4 factores limitantes), el 14 % como muy malos (pedregosos, con pendiente muy pronunciada, etc.) y solo el 15 % no posee factores limitantes. Unido a esto, el último mapeo agroquímico efectuado en el área ganadera, indicó que alrededor del 50 % de los suelos presenta niveles muy bajos de P asimilable, el 55 % muestra contenidos muy bajos de K intercambiable y la tendencia a la acidificación es evidente (Crespo, 2001).

Estas y otras limitaciones a la hora de disponer de un suministro adecuado de alimento en las praderas de esta región, ha llevado a buscar opciones que permitan su manejo de una forma más eficiente.

Una de estas alternativas para mejorar la calidad de las praderas tropicales es la introducción de leguminosas persistentes y compatibles con gramíneas. La asociación gramíneas - leguminosas puede representar una opción económica, para mejorar la producción animal en las regiones tropicales, contribuyendo así a la solución del problema de la alimentación en estas regiones (Rojas *et al.*, 2005).

### 2.6.1 Beneficios de la introducción de leguminosas en el sistema

Entre los beneficios de la introducción de este género de plantas en ecosistemas ganaderos están las características agronómicas y nutricionales que presentan, quienes las convierten en una formidable opción para la alimentación animal en los sistemas agrícolas - ganaderos. Esta familia de plantas puede contribuir a mejorar la calidad de las dietas de los animales, cuando son manejadas eficientemente en sistemas integrales (Ruiz *et al.*, 2005).

Las leguminosas tropicales son capaces de producir volúmenes de biomasa aceptables que complementan los sistemas ganaderos del trópico, presentando un grupo de ventajas que la destacan sobre las gramíneas que hacen que hoy en día su uso sea imprescindible. Crespo (2009), identificó que las principales cualidades nutricionales de las leguminosas se manifiestan por:

- Alto porcentaje de PB (15 - 30 %)
- Elevada digestibilidad (58 - 76 %)
- Buena provisión de vitaminas A, B, C y D.
- Abundante calcio
- Mayor contenido de fósforo que las gramíneas
- Alta capacidad de EM (2.2 - 2.7 Mcal/Kg de MS)

Debido a estas bondades, su asociación con las gramíneas forrajeras y de pastoreo propicia la obtención de una mayor cantidad de biomasa por unidad de área, con mayor calidad, y mejora sustancial de la relación proteína-energía de estos alimentos. (Rojas *et al.*, 2005)

La contribución de leguminosas mejoradas como componente forrajero es más importante cuando ellas se asocian con gramíneas, ya que se benefician del N fijado por las primeras (Tessema y Baars, 2006). Este proceso es posible por medio de la fijación simbiótica de este elemento que se establece entre la planta de leguminosa y algunas bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, las cuales infectan las raíces de la planta y se multiplican dentro de las células corticales, lo que induce la formación de nódulos radicales, en el interior de los cuales se realiza la fijación, con la intervención de la enzima nitrogenasa localizada en el interior de los rizobios (Helyar, 2003). En esta simbiosis las bacterias ceden el nitrógeno fijado a la planta y, en cambio, ésta le suministra al nódulo los carbohidratos que producen la energía necesaria para el proceso de fijación (Martínez *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta la degradación y la baja fertilidad general de la mayoría de los suelos que se utilizan en la ganadería en las zonas tropicales de América Latina y en Cuba, Crespo (2009) recomendó el uso de leguminosas, por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Giller y Cadisch, 1995). Se conoce la importancia que constituye este elemento tanto para las plantas como para la nutrición animal, contribuyendo a la capacidad de soporte del pasto, prolongando su capacidad productiva (Cantarutti *et al.*, 2002) y mejorando la calidad de la dieta (Paciullo *et al.*, 2003), lo cual influye positivamente en la producción animal.

Otro de los aportes se manifiesta en el aumento de la calidad nutritiva del forraje. Las gramíneas tropicales presentan contenidos de proteína total bajos, inferiores al 7 % durante la época seca, cuando el aporte de nitrógeno del suelo es deficiente, lo cual afecta el consumo voluntario y consecuentemente, la producción animal (Villaquirán y Lascano, 1986). La presencia de leguminosas en la asociación incrementa el valor nutritivo de la gramínea asociada, particularmente en lo que se refiere a los contenidos de proteína total y minerales, lo cual posibilita mantener su calidad a través del tiempo, sobre todo en la época seca (Rojas *et al.*, 2005). Una cualidad distintiva de las leguminosas es que presenta una menor variación estacional de su valor nutritivo en comparación con las gramíneas (Monteiro *et al.*, 1998), lo que contribuye lógicamente a mantener la calidad nutricional de la pradera durante todo el año.

El aumento en la producción de biomasa vegetal en la pradera asociada es otro de los aspectos a destacar. Las leguminosas incrementan la producción de materia seca del pastizal cuando éstas se asocian con gramíneas. Esta disponibilidad adicional de forraje incrementa la carga animal por unidad de superficie (Rojas *et al.*, 2005). Por citar un ejemplo, Costa *et al.* (1991) evaluaron tres gramíneas forrajeras, asociadas con cinco leguminosas, en el periodo de máxima precipitación, donde las asociaciones expresaron mayor rendimiento de forraje que las gramíneas en monocultivo. También Paciullo *et al.*, (2003) al evaluar la masa de forraje de un pastizal de *Brachiaria decumbens* (Stapf.) en monocultivo ó asociada con *Stylosanthes guianensis* (Aubl.), encontró notable incremento del rendimiento en la asociación que en monocultivo. En este y muchos otros estudios han sido demostrados los beneficios de estas asociaciones. Por otro lado, Vargas y Valdivia (2005), aseveran que las leguminosas rastreras permiten la recuperación de la fertilidad del suelo al mejorar la estructura y el pH,

favoreciendo la biodiversidad de la fauna edáfica y la cobertura del suelo. Además, numerosos estudios documentan que el contenido de carbono acumulado del suelo, entre los 20 y 80 cm de profundidad, se puede duplicar o triplicar con la inclusión de leguminosas en los pastizales (Arias *et al.* 2001).

Los beneficios que se obtienen con este sistema asociativo de gramíneas-leguminosas son reflejados en el aumento de la producción animal, obteniéndose una mayor ganancia de peso en menor tiempo, debido al incremento de la calidad nutricional en el pastizal por las características nutricionales de las leguminosas. Está bien documentado que las leguminosas, seleccionadas para suelos ácidos, en asociación con gramíneas, contribuyen a aumentar entre un 20 y 30 % la producción de leche y carne de animales alimentados en sistemas de pastoreos (Lascano y Ávila, 1991). También, Aroeira *et al.* 2005, al asociar *Stylosanthes guianensis* con *Brachiaria decumbens* en un suelo Latossolo Vermelho - Amarelo distrófico (Oxisol) concluyeron que el mayor porcentaje de estilósante en el pastizal contribuyó al aumento del consumo de forraje por los animales en este caso constituidos por vacas lecheras.

Este sistema de producción ganadero presenta también ventajas económicas debido a los incrementos que se logran en la producción de leche y carne (Lascano y Ávila, 1991). Además, se obtienen beneficios ecológicos producto de la mayor persistencia de las pasturas, así como a la reducción de la necesidad de fertilizantes nitrogenados y al secuestro de carbono en el suelo (Ibrahim, 1994; Ibrahim y Mannelje, 1998).

### **2.6.2 Factores que dificultan el éxito de asociaciones gramíneas-leguminosas**

Existen algunos factores que atentan contra el éxito de las asociaciones gramíneas-leguminosas. Una de las preocupaciones mayores es la persistencia de esta última en el pastizal. Al respecto, González *et al.*, (2004) plantearon que el aumento de la carga animal atenta contra estas asociaciones, disminuyendo el porcentaje de leguminosas en el pastizal. Chacón y Stobbs, (1976) se refirieron a la afectación de la presencia de la leguminosa en el pastizal a causa del pisoteo y el tamaño del bocado.

También, el decrecimiento del porcentaje de la leguminosa en la asociación, puede ser atribuido a la competencia por la luz, agua y nutrientes, ejercida por la

gramínea (estas presentan un desarrollo más rápido que las leguminosas por presentar un mayor ritmo de crecimiento), por ser una planta de mayor eficiencia fotosintética (ciclo C4) en condiciones tropicales y de mejor adaptación a las condiciones de suelos de baja fertilidad (Aroeira *et al.*, 2005)

No obstante, estos problemas pueden ser resueltos con un manejo adecuado del sistema. Un ejemplo de ello lo obtuvieron Castillo *et al.* (1991), quienes lograron mayor persistencia de la leguminosa al aumentar el número de cuartones de 2 a 4, logrando un mejor resultado cuando el aumento fue a 6 (Castillo *et al.*, 2002).

Por otro lado (Ruiz y Febles, 2001) plantean que aunque durante un largo período, en el Instituto de Ciencia Animal (ICA), se han realizado estudios en asociaciones gramíneas-leguminosas en cuanto a cambios en su manejo, que logran una mayor persistencia de estas, consideran que es necesario seguir profundizando en los métodos de establecimiento. Esto se debe a que con los métodos existentes se obtienen pastizales con baja población de leguminosas, y pocos puntos de enraizamiento, así como, que los métodos de cultivo mínimo no logran un lecho adecuado para la germinación, emergencia y desarrollo de la semilla de leguminosas que se pretende introducir.

Según los propios autores, los estudios relacionados con el establecimiento y explotación del pastizal deben estar encaminados a lograr una mayor cantidad de plantas y puntos enraizados por área. Ellos proponen que al aumentar el número de especies de leguminosas rastreras en la asociación, las malezas desaparecen en el tiempo, mientras las plantas y los puntos enraizados aumentan, lo cual sitúa a las leguminosas en una mejor posibilidad de resistir el impacto de los animales durante el pastoreo (Ruiz y Febles, 2005).

Independientemente de las dificultades para su establecimiento, se han obtenido buenos resultados en este tipo de asociaciones, tal es el caso de Silva y Saliba (2007), quienes en varios estudios de consorcio de brachiaria con leguminosas, obtuvieron incrementos tanto en la producción total de biomasa, comparado con sistema de monocultivo, como en el aumento de peso de los animales. Argel y Villarreal (1998) y Valentim *et al.*, (2001) también obtuvieron resultados positivos en este tipo de asociaciones.

## 2.7 Fijación biológica del N en leguminosas

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) puede definirse como la oxidación o reducción del nitrógeno para dar amonio u óxidos, y consiste en la conversión del nitrógeno atmosférico a formas metabolizables, que puedan ser incorporadas por los seres vivos. Estas formas son el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o los iones nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Calvo, 2011).

Este fenómeno ha adquirido gran importancia desde el punto de vista agrícola y ecológico, desde los últimos años del siglo pasado. Es limitado el número de especies procariontas que se involucran en este fenómeno, conformado generalmente por bacterias y algas verdes - azules (*Cyanophyceae*), que puede manifestarse en procesos de tipo simbiótico o no simbiótico. Las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, principalmente los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, se encuentran dentro del grupo de microorganismos que establecen simbiosis con plantas de la familia *Fabaceae*. Estos microorganismos invaden las raíces de estas plantas y provocan la formación de nódulos, en los cuales se establece la simbiosis en la que se fija el N atmosférico (Nápoles *et al.*, 2008). A demás, existe otro grupo de bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Clostridium*, entre otras, denominadas de vida libre, las cuales habitan en la rizosfera, pero sin tener contacto directo con las raíces de las plantas (Mayea *et al.*, 1991; Bauer, 2001).

El ambiente natural de los rizobios (bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*) es el suelo, no obstante, existen diversos factores que condicionan y determinan su actividad y sus poblaciones, como son: el pH, la temperatura, la humedad, las fuentes de energía (Jiménez y Peña, 2000) y la toxicidad por Al (Castillo, 2008). También los altos niveles de fertilización nitrogenada en la leguminosa inhiben esta fijación biológica, por lo que no se recomienda su aplicación, al menos en altas dosis (Binder, 1997). Igualmente, la salinidad del suelo conspira con los procesos funcionales de la simbiosis leguminosa - rizobio, afectando indicadores como: número de nódulos, materia seca de los nódulos, masa seca y el nitrógeno total de la parte aérea de la planta (López, 1998), además del contenido de leghemoglobina y la actividad de la enzima nitrogenasa (Bolaños *et al.*, 2006; Khadri *et al.*, 2007). No obstante, se han aislado y probado cepas que ayudan a aumentar la tolerancia de las plantas a este tipo de estrés (López *et al.* 2000; Gómez *et al.*, 2013).



Existe determinado grado de especificidad entre simbiote y macrosimbiote, los que manifiestan ser selectivos entre ellos para efectuar la infección nodular y la FBN. Para la ocurrencia de una eficiente simbiosis se necesita de la presencia de cepas eficientes en la rizosfera de la leguminosa (García *et al.*, 2000).

Al nivel de la rizosfera ocurre un intercambio de señales entre las bacterias de rizobios y las raíces de leguminosas, influyendo directamente en el grado de especificidad entre especies y estirpes de bacterias y plantas. El primer nivel de especificidad en la interacción lo constituye la excreción por las raíces de la leguminosa de metabolitos secundarios hacia la rizosfera, entre ellos los flavonoides y chalconas son los más importantes en esta interacción. En dependencia de la planta y la bacteria, compuestos específicos de estos servirán como señales inductoras de los genes Nod mediante la proteína Nod D en *Rhizobium* (Nápoles *et al.*, 2008). Un segundo nivel lo conforma una señal de retorno producida por los genes de nodulación, los lipoquitinolisacáridos, comúnmente llamados Factores de nodulación o Factor Nod (Spaink *et al.*, 1991; Schultze *et al.*, 1992).

La simbiosis que se establece entre rizobios y leguminosas se destaca sobre otros sistemas capaces de fijar N atmosférico. Este fenómeno contribuye con el gran aporte de N al ecosistema y a la producción de biomasa vegetal, enmarcando la producción de alimentos tanto para las poblaciones humanas como animales, se calcula que alcanza el 20 % de la cantidad total del N fijada anualmente sobre el planeta (Martínez - Viera y Dibut, 2012).

Mediante los numerosos estudios realizados mundialmente, se estima que la FBN contribuye con el suministro de N a las plantas en dependencia de la eficiencia de la asociación y de la disponibilidad del elemento en el suelo cuando los factores ambientales son adecuados (Olivares, 2006).

## **2.8 Hongos micorrízicos arbusculares**

La asociación simbiótica mutualista que se establece entre la mayoría de las plantas vasculares y ciertos hongos del suelo, los cuales colonizan el tejido cortical de las raíces durante el período de crecimiento activo de la planta, es denominada con el término micorriza (Brundrett, 2002; Smith y Read, 2008).

Este fenómeno ha sido muy estudiado por lo que representa para el desarrollo de las especies de plantas que efectúan esta asociación. Actualmente se reconocen

tres tipos de asociaciones micorrízicas en base a sus características anatómicas y estructurales (ectomicorrizas, ectendomicorrizas y endomicorriza) (Read, 1998); sin embargo, son las micorrizas arbusculares, que pertenecen al tipo endomicorrizas, las que constituyen el tipo de asociación simbiótica más extendido en la naturaleza, estableciéndola con más del 80 % de las plantas vasculares. Estas se encuentran prácticamente en la totalidad de los ecosistemas terrestres (Allen *et al.*, 2003; Cornejo, 2006) y en el 85% de las plantas con interés agronómico Fernández (2012).

Esta asociación clasifica como simbiótica mutualista, ya que los organismos coexisten en un mismo ambiente físico: raíz y suelo, y porque ambos simbiontes se benefician de la asociación, de manera que el hongo recibe energía para su crecimiento y manutención de los productos fotosintéticos de la planta, (Cruz *et al.*, 2007; Smith y Read, 2008), y esta es abastecida de nutrientes y agua a través de la red de hifas del hongo (Berbara *et al.*, 2006; Siddiqui *et al.*, 2008)

Debido a la estructura extremadamente larga y fina de las hifas extrarradicales del hongo, estas pueden explorar volúmenes de suelo muy superiores que las estructuras radicales de la planta (Read y Pérez - Moreno, 2002). Estas hifas se extienden varios centímetros en el suelo y ayuda a las plantas a absorber los nutrientes minerales, especialmente los que se encuentran en formas menos disponibles, tales como el P, el Zn y el Cu (Marschner y Dell, 1994). De esta forma dichos microorganismos influyen en el crecimiento de las plantas (Klironomos, 2003; Koide y Mosse, 2004).

A estos hongos también se les atribuye otros efectos, tales como: resistencia de las plantas al ataque de patógenos del sistema radical (Klironomos, 2003; Akhtar y Siddiqui, 2007), presencia de metales pesados en el suelo en niveles preocupantes (Klauber Filho *et al.*, 2005), estrés hídrico (Montaño *et al.*, 2007) y condiciones extremas de pH en el suelo (Kanno *et al.*, 2006). También contribuyen a la formación de agregados estables en el suelo que favorecen su estructura física producto de las proteínas relacionadas con la glomalina (PSRG) secretada por el hongo durante la asociación (Driver *et al.*, 2005; Rillig y Mummey, 2006; Purin *et al.*, 2007).

### 2.8.1 Importancia de los HMA en la nutrición de las plantas

Muchos estudios se han llevado a cabo relacionados con el papel de los hongos micorrízicos arbusculares en la nutrición de las plantas, debido principalmente a su influencia en el crecimiento y desarrollo de estas. Esto está estrechamente ligado al mayor volumen de suelo que exploran las raíces de las plantas micorrizadas, que las capacita para acceder a nutrientes de fuentes minerales y orgánicas menos accesibles en el suelo (Covacevich *et al.*, 2006; Leigh *et al.*, 2009).

Es conocida la absorción de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NH}_3^-$ ) del suelo a través del micelio extrarradical de los HMA (Villegas y Fortín, 2002; Govindarajulu *et al.*, 2005), y existen criterios sobre la posible absorción de cantidades importantes de N orgánico (Gryndler, *et al.*, 2009; Leigh *et al.*, 2009). Esto parece estar relacionado con la presencia de un transportador de alta afinidad por el  $\text{NH}_4^+$ , expresado en las hifas extrarradicales de *Glomus intraradices* (López-Pedrosa *et al.*, 2006).

También se ha comprobado la transferencia a través de este mecanismo, de nutrientes como el K, Ca, Mg y S, y de micronutrientes como el zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo) (Cardoso y Kuyper, 2006). Aunque no abundan los estudios sobre los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que regulan los procesos de absorción de estos elementos, se ha sugerido que la influencia de los HMA en su absorción y transferencia, está directamente relacionada con el aumento del volumen de suelo que pueden explorar las estructuras fúngicas (Janos, 2007).

La absorción del P es considerado el beneficio más importante debido al incremento que se produce de este elemento en los tejidos de la planta (Helgason y Fitter, 2009), siendo de las más estudiadas, ya que de las cantidades presentes de este elemento en el suelo, entre un 90 y un 95% se encuentran de forma no disponible para las plantas (Smith y Read, 2008). Fundamentalmente en las zonas tropicales, este elemento se encuentra en bajas concentraciones y su baja movilidad es su característica distintiva. Es precisamente en estas condiciones en que se pone de manifiesto el efecto beneficioso de la simbiosis, siendo determinante en la supervivencia de diversas especies vegetales, sobre todo de aquellas incapaces de absorber formas menos móviles de este elemento (Atul-Nayyar *et al.*, 2009).

La presencia de transportadores de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  de alta afinidad, determina que la absorción y transferencia de P a la planta mediante las hifas del hongo, sea un proceso rápido y eficiente (Requena *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2008). El  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  absorbido es rápidamente transformado en polifosfato en el micelio extrarradical (Ezawa *et al.*, 2004). Conjuntamente con estos procesos, los ácidos orgánicos y las fosfatasas que producen las hifas extraradicales, posibilitan la solubilización del fósforo fijado en el suelo (Koide y Kabir, 2000; Wang *et al.*, 2004).

Al interactuar los HMA con otros microorganismos ocurren cambios que también influyen en la nutrición de las plantas. Entre ellos podemos mencionar el suministro de energía a través de compuestos carbonados procedentes de la planta hospedera, los cambios en el pH de la micorrizosfera inducidos por el hongo y la exudación de sustancias que estimulan o inhiben la actividad de los otros microorganismos (Atul-Nayyar *et al.*, 2009). Autores como Barea *et al.* (2002); Chalk *et al.* (2006) y Tajini y Drevon, (2012), observaron el sinergismo manifestado entre los HMA y las rizobacterias fijadoras de N, solubilizadoras de fosfatos o promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), acompañado de mejoras en el estado nutricional de las plantas.

### **2.8.2 Micorrizas en agroecosistemas de pastizales**

Los ecosistemas de pastizales se distinguen por poseer una alta población de hongos micorrízicos. Esta característica puede deberse a que en este tipo de sistemas la realización de labores de preparación de suelo es mínima o nula, teniendo en cuenta que según estudios de González *et al.*, (2007) los antecedentes culturales afectan en cierta medida las poblaciones de estos hongos, provocando la ruptura y muerte de las hifas y a la reducción de la densidad de las esporas, ya sea por la inversión del prisma o por la acción mecánica de los implementos agrícolas en las estructuras micorrízicas del pasto (Boddington y Dodd, 2000; Galvez *et al.*, 2001).

Miller *et al.* (1995) plantearon que en los suelos cubiertos de pastizales, las hifas extrarradicales forman una extensa red de micelios que puede alcanzar hasta 111 m por  $\text{cm}^3$  de suelo. Esas hifas continúan colonizando y conectan los sistemas radicales de las comunidades de plantas que cohabitan en el mismo. Al mismo tiempo, a través de la reproducción asexual de las esporas del hongo se

garantiza la renovación de sus estructuras, manteniendo así un sistema complejo y eficiente de absorción de nutrientes (González, 2014).

También el tipo de plantas que abundan en las praderas puede influir en la abundancia de estos microorganismos en el suelo. Se han encontrado gramíneas características de estos sistemas, que presentan un grado importante de colonización por HMA y responden favorablemente a dicha asociación (Hetrick *et al.*, 1990; Hartnett y Wilson, 1999, 2002). Normalmente aquellos grupos de especies que poseen sistemas radicales con altos valores de frecuencia de ramificación, alta densidad y amplia longitud de raíces, como muchas gramíneas (Koide, 1991; Brundrett, 2002), presentan menor dependencia micorrízica, lo cual no necesariamente es proporcional al nivel de colonización (Smith *et al.*, 2003).

Por otro lado, ha sido estudiado el efecto del pastoreo sobre la colonización de los pastos por los HMA. Autores como Hetrick *et al.*, (1990) y Gehring y Whitham (1994, 2002), encontraron que la intensidad de colonización disminuye bajo regímenes intensos de pastoreo, mientras que en sistemas pastoriles de moderada intensidad la colonización no es afectada (Lugo *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2004; Pietikäinen *et al.*, 2005) o aumenta (Kula *et al.*, 2005; Wearn y Gange, 2007).

## **2.9 Interacción HMA - rizobios**

Se ha demostrado los beneficios de la interacción entre los hongos micorrízicos arbusculares y los rizobios. En su mayoría, las bacterias de la rizósfera y los hongos son altamente dependientes de las asociaciones con las plantas y están claramente reguladas por exudados de las raíces (Bonfante y Anca, 2009).

La simbiosis tripartita HMA-rizobio-leguminosa es un ejemplo de dicha interacción, sobre la que han sido informados resultados que revelan que se obtiene un mayor intercambio entre los simbioses y efectos superiores a las plantas, comparado con las relaciones basadas en asociaciones no simbióticas. En este caso, el rizobio aporta el nitrógeno fijado, mientras que los HMA incrementan la absorción de otros elementos como el P, el cual se destaca por la importancia que tiene en el proceso de fijación simbiótica del N<sub>2</sub> (Rivera y Fernández, 2003; Rabie *et al.*, 2005).

Se ha planteado que la colonización de las raíces por los HMA puede afectar directa o indirectamente a las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera.

Las directas abarcan el suministro de energía mediante compuestos ricos en carbono, que son transportados desde la planta hospedera hacia la micorrizosfera mediante las hifas del hongo (Bonfante y Anca 2009). Las indirectas se relacionan con los efectos de los HMA en el crecimiento de la planta hospedera, la exudación de sustancias estimuladoras del crecimiento y la mejora de la estructura del suelo, factores que incrementan la actividad de las bacterias nitro fijadoras (Antoun y Prévost 2005).

González *et al.*, (2012), al evaluar el efecto de la coinoculación de cepas de rizobios y una cepa de HMA (*Glomus cubense*), en plantas de Kudzú (*Pueraria phaseoloides*), corroboró estos planteamientos, al obtener incrementos en los rendimientos y el contenido nutricional del pasto en los tratamientos donde se combinaron ambos microorganismos. También Martín *et al.*, (2015), obtuvo mayores valores de MS en el cultivo de canavalia (*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.), al inocular con cepas específicas por tipo de suelo.

Trabajos como el referido anteriormente reflejan que la interacción entre estos microorganismos requiere de ciertas condiciones para lograr establecer una simbiosis efectiva, el pH, la fertilidad y la humedad del suelo son algunos de los factores que más influyen. Por otro lado Tajini y Drevon (2012) plantean la existencia de cierto grado de especificidad entre bacterias y HMA. Cuando se asocian bacterias específicas con hongos micorrízicos se puede crear un sinergismo indirecto, manifestándose positivamente en el crecimiento vegetal, la adquisición de nutrientes (Barea, 1997; Barea *et al.*, 2002) y el aumento de la ramificación radical (Gamalero *et al.*, 2004).

## **2.10 Perspectiva del manejo de biofertilizantes en los agroecosistemas de pastizales**

La pérdida de la fertilidad de los suelos en ecosistemas de este tipo y su empobrecimiento en general es una de las causas fundamentales de la degradación de los pastizales. Entre los factores que influyen en ella podemos mencionar el clima, la disponibilidad de los nutrientes, el sistema de explotación, la composición de las especies de pastos, el tipo y estructura del suelo, así como la macro, meso y microorganismos que habitan en la comunidad edáfica (Herzog *et al.*, 2008; Phoenix *et al.*, 2008).

Los HMA contribuyen a la reducción de la pérdida de nutrientes en estos ecosistemas. González (2014), encontró que un pastizal de brachiaria inoculada con *G. cubense* en suelo Ferralítico rojo, no mostró pérdidas significativas del P asimilable en el suelo durante seis años sin fertilizar con portadores de este elemento. También Van der Heijden (2010) observó en tres pastizales micorrizados, formados cada uno por una especie de pasto, que las pérdidas de P y N se redujeron significativamente, en comparación con aquellos formados por esas mismas especies, pero en ausencia de micorrización. Estos resultados reflejan la contribución de los HMA a la sostenibilidad del ecosistema, reduciendo las pérdidas de estos elementos.

Por otro lado, el aporte de nitrógeno a través de la fijación biológica de este elemento, llevado a cabo mediante la simbiosis rizobios-leguminosas, constituye uno de los componentes primordiales de la sustentabilidad agrícola. El ahorro de fertilizantes nitrogenados que puede representar el manejo eficiente de biofertilizantes basados en estos microorganismos puede ser de gran importancia económica, y un favorable impacto ecológico, lo cual contribuye a la conservación de los suelos y las aguas subterráneas.

Se calcula que a través de este fenómeno se alcanza el 20 % de la cantidad total del N fijada anualmente sobre el planeta (Martínez - Viera y Dibut, 2012).

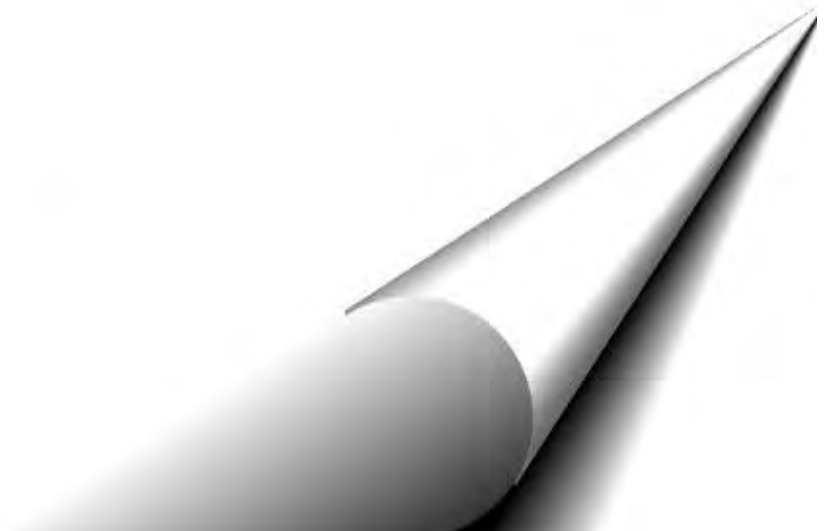
Debido a la multiplicidad de especies y estirpes de rizobios conocidos, y la especificidad que muestran respecto al hospedero y condiciones del suelo, será necesario continuar el trabajo de aislamiento de cepas y estudiar su efectividad en distintos escenarios. Lo mismo sucede con los HMA, con la diferencia de que su funcionamiento eficiente está dado en menor medida por la especie de planta con la que realiza simbiosis, pero mayormente influenciado, al parecer, por las características químicas del suelo, principalmente su rango de pH (Rivera *et al.* 2003).

Luego de años de investigaciones en Cuba sobre los beneficios que estos microorganismos ejercen en los cultivos, los resultados obtenidos apuntan hacia la utilización de una tecnología que consista en la aplicación conjunta de biofertilizantes basados en estos microorganismos. Ejemplo de esto son los incrementos obtenidos en el rendimiento de granos del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L, variedad CC-25-9 negro) (González *et al.*, 2012a) y en el rendimiento

y valor nutricional del kudzu (*Pueraria phaseoloides*, vc. CIAT-9900) (González et al., 2012b).



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



### III. Materiales y Métodos generales

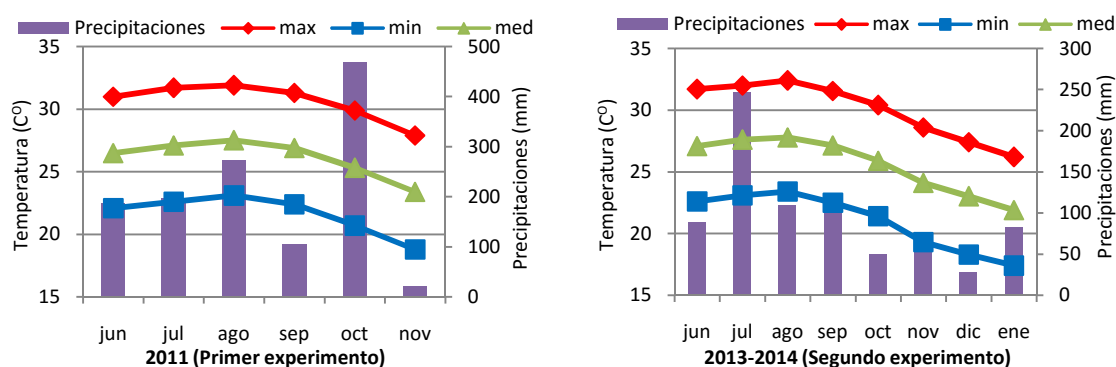
#### 3.1 Condiciones experimentales

Se realizaron dos experimentos, ambos se ejecutaron en La Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Cascajal, ubicada en Santo Domingo, provincia de Villa Clara, Cuba.

##### 3.1.1 Clima y suelo

La estación está situada a los 31° grado a 21' de latitud este y a los 20° grados y 21' de longitud oeste a 60 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media fluctúa entre los 22,0 y 27,8°C, y la humedad relativa entre el 79 y 84 %. El promedio anual de precipitaciones es de 1 264 mm, de esta cantidad, el 75 % (948,75 mm) ocurre en el periodo lluvioso (mayo-octubre) y el 25 % (361,25 mm) en el poco lluvioso (noviembre-abril) (Olivera *et al.*, 2012).

La figura 1 muestra los datos de las variables meteorológicas durante el período en que se ejecutaron los experimentos, tomados en la propia Estación Experimental.



**Figura 1. Comportamiento de variables meteorológicas en los períodos experimentales.**

Los experimentos se desarrollaron en condiciones de campo, sobre un suelo Gleysol Nodular Ferruginoso, dentro del sub tipo GNF arénico, álbico y petroférico, según la Versión de Clasificación de los Suelos de Cuba 2015 (Hernández *et al.* 2015). La tabla 1 muestra sus principales características químicas y el número de esporas presentes al inicio de los experimentos. En el Anexo 1 se presenta la descripción y foto del perfil con los datos correspondientes.

**Tabla 1. Características químicas del suelo y número de esporas (0 – 20 cm de profundidad).**

Área experimental	pH	MO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ca	Mg	Na	K	CCB	# esporas
	H <sub>2</sub> O	(%)	(mg.100g <sup>-1</sup> )	(cmol.kg <sup>-1</sup> )					En 50 g de suelo
Expo. 1	4.7	2.43	2.2	3.5	1.2	0.10	0.11	4.91	175
IC±	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	
Expo. 2	4.9	2.36	1.8	3.56	1.51	0.14	0.11	5.31	328
IC±	0.01	0.03	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	

CCB (Capacidad de Intercambio de Bases). MO: materia orgánica. CCB: capacidad de intercambio de bases. IC: intervalo de confianza ( = 0.05).

Los resultados muestran que el contenido de materia orgánica (MO) es bajo; el pH es fuertemente ácido; el fósforo (P) se considera bajo y los valores de calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K) y la capacidad de cambio catiónico (CCB) presentan valores muy bajos, según Paneque *et al.*, (2001).

### 3.1.2 Material vegetal

El material vegetal empleado en ambos experimentos fue la especie *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184. En el segundo experimento se empleó, además, la especie *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk.

## 3.2 Descripción de los experimentos

### 3.2.1 Experimento 1. Coinoculación de aislados de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular en *Stylosanthes guianensis*

En este experimento se seleccionaron aislados de rizobios efectivos para *S. guianensis* y se evaluó el efecto de su coinoculación con *Funneliformis mosseae*. Para ello se evaluaron ocho tratamientos (Tabla 1), los cuales se distribuyeron en un diseño de bloques al azar con cuatro réplicas. Las parcelas constituyeron la unidad experimental, y tenían una superficie total de 2 m<sup>2</sup> y un área de cálculo de 14 m<sup>2</sup>.

**Tabla 2: Descripción de los tratamientos del primer experimento.**

Tratamientos	Cepa de rizobio	Cepa de HMA
1	NI	NI
2	Sty-1	NI
3	Sty -2	NI
4	Sty -3	NI
5	NI	<i>F. mosseae</i>
6	Sty -1	<i>F. mosseae</i>
7	Sty -2	<i>F. mosseae</i>
8	Sty -3	<i>F. mosseae</i>

NI: no inoculado. Sty-1 Sty-2 y Sty-3 (cepas de rizobios)

El experimento se condujo durante el período junio a noviembre de 2011. La preparación del suelo se realizó de forma convencional, con las labores de roturación, grada ligera, cruce, grada y surcado. La siembra se realizó en surcos separados a 70 cm y a chorrillo, con una dosis de 8 kg de semilla total ha<sup>-1</sup> (2 kg de semilla pura germinable ha<sup>-1</sup>). Antes de la siembra, la leguminosa fue inoculada con cada microorganismo, según el tratamiento. El experimento se condujo en condiciones de secano y no se aplicaron fertilizantes ni mejoradores de la fertilidad del suelo.

Se determinó el contenido de esporas de HMA en el suelo al inicio y al final del experimento, así como la frecuencia e intensidad de la colonización micorrízica a los 120 días después de la siembra (dds). Al inicio de la floración se determinó el número de nódulos por planta y su efectividad, y se realizaron dos cortes del forraje, a los 60 y 120 dds, para determinar el rendimiento de MS (t ha<sup>-1</sup>) y las concentraciones de N, P y K del estilosante.

### 3.2.2 Experimento 2. Establecimiento de *Stylosanthes guianensis* vc. CIAT-184 coinoculado con rizobios y *F. mosseae* en un pastizal de *Brachiaria decumbens*

En este experimento se evaluó el efecto de la coinoculación con aislados de rizobios y *F. mosseae* en el establecimiento de *S. guianensis* en un pastizal de *B. decumbens*. En el mismo se evaluaron cuatro tratamientos, los cuales se describen en la tabla 3, en un diseño de bloques al azar con cinco réplicas.

**Tabla 3. Descripción de los tratamientos del segundo experimento.**

Tratamientos	Especies de pasto	Inoculación.
T1	<i>B. decumbens</i> (monocultivo)	NI
T2	<i>B. decumbens</i> + <i>S. guianensis</i>	NI
T3	<i>B. decumbens</i> + <i>S. guianensis</i>	<i>F. mosseae</i> + Sty-2
T4	<i>B. decumbens</i> + <i>S. guianensis</i>	<i>F. mosseae</i> + Sty-3

NI: no inoculado. Sty-2 y Sty-3 (aislados de rizobios)

Los tratamientos se distribuyeron en parcelas de 20 m<sup>2</sup>, las cuales constituyeron la unidad experimental.

Este experimento se condujo desde junio de 2013 hasta enero de 2014. La leguminosa se sembró en un pastizal ya establecido de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, con una dosis de 8 kg de semilla total ha<sup>-1</sup> (2 kg de semilla pura germinable ha<sup>-1</sup>). Antes de la siembra, la brachiaria fue sometida a un pastoreo profundo con el objetivo de disminuir su altura, para luego distribuir a voleo las semillas de estilósante, coinoculadas o no según el tratamiento.

Se determinó el número de esporas en el suelo al inicio y final del experimento, así como las variables fúngicas y el número y la efectividad de los nódulos a los 180 días después de la siembra. Al final del experimento también se determinó el rendimiento de MS y las concentraciones de proteína bruta (PB), P, K, fibra neutro detergente (FND) y digestibilidad de la materia orgánica (DMO) del follaje de la asociación. Además se hicieron tres muestreos (al inicio y a los 95 y 180 dds) para determinar la composición botánica de cada parcela. El experimento se

condujo en condiciones de secano y no se aplicaron fertilizantes ni mejoradores de la fertilidad del suelo.

### **3.3 Procedimiento general y determinaciones realizadas**

#### **3.3.1 Muestreos y análisis de suelos**

Al inicio de ambos experimentos se hicieron muestreos de suelo para determinar sus características químicas. Para ello se tomaron 5 submuestras a una profundidad de 0-20 cm en puntos equidistantes ubicados en el área de cálculo, para formar una muestra compuesta por parcela.

Para la caracterización química se emplearon los siguientes métodos, establecidos en el Laboratorio de Análisis de Suelos del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) y descritos en el manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos (Paneque *et al.*, 2011):

- pH H<sub>2</sub>O: Potenciometría: relación suelo - agua: 1: 2. 5.
- MO: Walkley y Black.
- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> asimilable: Oniani (extracción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup>).
- Cationes intercambiables: extracción con NH<sub>4</sub> Ac 1 mol L<sup>-1</sup> a pH 7 y determinación por valoración con EDTA (Ca y Mg) y fotometría de llama (Na y K).
- CIB: suma de cationes intercambiables.

#### **3.3.2 Métodos de inoculación de los biofertilizantes empleados**

Se emplearon tres aislados de rizobios denominados Sty-1, Sty-2 y Sty-3 los cuales pertenecen al cepario del Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Estos microorganismos, posibles miembros del género *Bradyrhizobium* por sus características culturales, morfológicas y algunas fisiológicas; fueron obtenidos del interior de nódulos de plantas de *Stylosanthes guianensis* (sin inocular) que habían crecido espontáneamente como parte de un pastizal de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú (Pérez *et al.*, 2008).

También, en ambos experimentos se utilizó una cepa de hongo micorrízico arbuscular (HMA) denominada INCAM-2, de la especie *Funneliformis mosseae*

(Nicol. & Gerd.) (Schüßler y Walker 2010). Esta cepa, reproducida en el cepario de micorrizas del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, también del INCA, fue seleccionada debido a su alta eficiencia, según estudios previos de cepas de HMA-especies de pastos que se realizaron en las propias condiciones edáficas donde se condujo el experimento (Ramírez *et al*, 2006).

Se utilizó para ambos microorganismos inoculantes que, en el caso del rizobio contenía  $10 \times 10^{10}$  UFC  $g^{-1}$ , y 33 esporas.  $g^{-1}$  la cepa de HMA. Los inoculantes contenían similar número de microorganismos en ambos experimento, para garantizar la semejanza entre ellos. Se aplicaron por el método de recubrimiento de la semilla al momento de la siembra, en cantidades equivalentes a 4.41 mL y 100 g de inóculo de rizobio y HMA respectivamente por cada kg de semilla (Fernández *et al*. 2001).

### **3.3.3 Composición botánica del pastizal**

Para determinar la composición botánica del pastizal se empleó el método del rango en peso seco, adaptado de t' Mannelje y Haydock, (1963). Para ello se colocó, dos veces en la parcela, un marco de 25 x 25 cm y se cortó el material vegetal dentro del cuadro. Consecutivamente, las muestras fueron secadas en la estufa a 70 C° durante 72 h hasta obtener un peso constante para determinar el porcentaje de (MS) del peso total de la muestra. Más adelante, se separaron las especies de pastos de la muestra agrupada de la manera siguiente: (*B. decumbens*, *S. guianensis* y otras especies), se determinó el peso de MS por especie y el porcentaje que representó cada una mediante la fórmula:

$$\% \text{ de la especie} = \text{MSE} \times 100/\text{MST}$$

Donde MSE es el peso de masa seca de la especie y MST el peso de masa seca total de la muestra.

### **3.3.4 Rendimiento de masa seca**

Para determinar el rendimiento de MS del estilósante en el primer experimento se cortó el pasto en el área de cálculo de cada parcela, a una altura de 10 cm de la superficie del suelo.

En el segundo experimento, se colocó un marco de 0,25 m<sup>2</sup>, dos veces en cada parcela y se cortó el pasto dentro de cada uno de ellos, a una altura de 10 cm.

En ambos casos, a partir de la muestra original, se tomaron muestras de 200 g de masa verde (MV) de la parte aérea de las plantas, las cuales se secaron en estufa

a 70°C durante 72 h para determinar el porcentaje de masa seca (MS). El rendimiento de MS se calculó mediante la fórmula: **Rendimiento de MV \* % de MS / 100**.

### 3.3.5 Concentraciones de nutrientes

Las muestras tomadas para determinar el rendimiento de MS, fueron molinadas y llevadas al laboratorio de análisis químico para determinar las concentraciones de N, P y K de la biomasa de la parte aérea del pasto, mediante las metodologías descritas por (Paneque *et al.*, 2011):

N: digestión húmeda con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + Se y determinación colorimétrica con el reactivo de Nessler.

P: digestión húmeda con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + Se y determinación colorimétrica con el reactivo molibdato de amonio.

K: digestión húmeda con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + Se y determinación por fotometría de llama.

Estos elementos se determinaron en ambos experimentos.

En el segundo se determinó, además, la fibra neutro detergente (FND) (Van Soest *et al.* 1991) y la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) en KOH (Kesting 1977). También se calculó la concentración de proteína bruta = N x 6.25, según AOAC (1995).

### 3.3.6 Variables fúngicas

Para la estimación de los indicadores de frecuencia e intensidad de la colonización (IC), las muestras de raíces fueron lavadas y secadas en la estufa a 70 °C hasta obtener un peso constante y se tiñeron según la metodología descrita por Rodríguez *et al.*, (2015).

Para el cálculo se utilizó la metodología descrita por Trouvelot *et al.* (1986), la que permite evaluar la ocupación fúngica de cada intercepto mediante la asignación de un nivel (Tabla 4) y utiliza la fórmula: **% IC = A / Z**

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



**Tabla 4. Transformación de los porcentajes de ocupación fúngica intrarradical en niveles, según Trouvelot (1986).**

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

También al inicio y al final de cada experimento se tomaron muestras de la rizosfera en las parcelas, para determinar la concentración de esporas según la metodología descrita por Gerdemann y Nicholson, (1963); modificada por Herrera *et al*, (1995), basado en el tamizado y decantado por vía húmeda de los propágulos del hongo. Las esporas se colectaron sobre una malla de 40 µm de apertura, se separaron por centrifugación con sacarosa y Tween 80 y se observaron posteriormente en un estéreo microscopio óptico (20 - 40x).

### **3.3.7 conteo y determinación de la eficiencia de los nódulos de rizobios**

En el inicio de la fase de floración de cada experimento se extrajeron de cada parcela 10 plantas de *S. guianensis* con sus raíces respectivas, para determinar el número de nódulos por planta. Una vez llevadas las plantas al laboratorio se procedió a realizar el conteo de nódulos en raíces cuidadosamente lavadas junto con la observación cualitativa del tamaño y tonalidad interna, su efectividad se determinó observando mediante un corte transversal del nódulo, aquellos que presentaron coloración roja a rosada (apreciación: +++ y ++, respectivamente) por evidenciar presencia de leghemoglobina, mientras que el color blanco (apreciación: +) se consideró como nódulo joven (FAO 1985).

### **3.4 Análisis estadístico**

Para el procesamiento estadístico se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza por la prueba de Levene, los cuales cumplieron con este requisito, por lo que se procedió a realizar el análisis de varianza a los datos originales según Vásquez (2011). Los resultados de ambos experimento se evaluaron mediante el análisis de varianza, utilizándose un modelo matemático de clasificación doble. Se empleó la dócima de comparación múltiple de Duncan (1955) en los casos en que hubo

diferencias significativas entre tratamientos, para establecer las diferencias significativas entre las medias. Los cálculos se realizaron a través del paquete estadístico IBM SPSS Statistics 19.

### 3.5 Valoración económica

Para la valoración económica se realizó una comparación entre los costos del tratamiento de la brachiaria en monocultivo, el de la asociación de la brachiaria con estilósante y la asociación en presencia de la inoculación de rizobios y HMA. Para ello se utilizaron los siguientes indicadores:

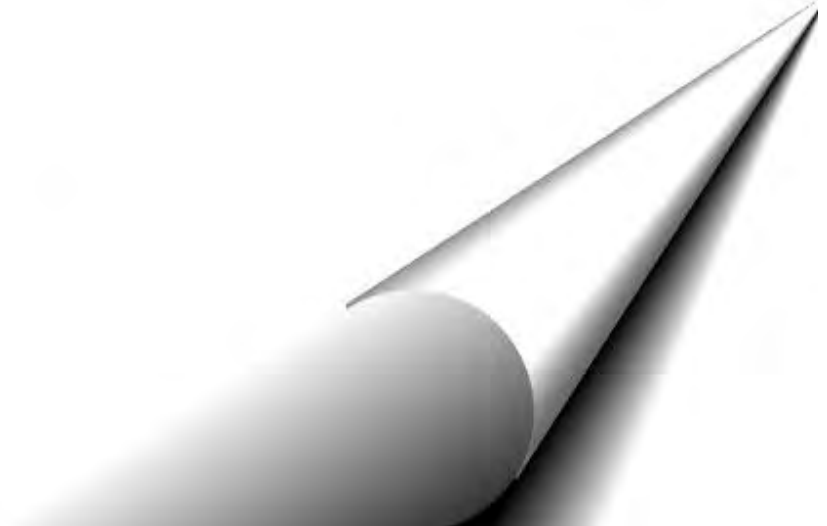
- 1- Costo del establecimiento de la leguminosa (CUP ha<sup>-1</sup>): Sumatoria de los gastos incurridos por la depreciación del pastizal de brachiaria, los precios de la semilla de estilósante y de los inoculantes.
- 2- Costo de la biomasa producida en el pastizal (CUP t<sup>-1</sup> MS): costo del establecimiento de la asociación (CUP ha<sup>-1</sup>) / rendimiento de MS (t ha<sup>-1</sup>) de cada tratamiento.
- 3- Ahorro por disminución del costo de la biomasa producida (CUP t<sup>-1</sup> MS): diferencia del costo unitario de la biomasa producida en el pastizal (CUP t<sup>-1</sup> MS) entre el tratamiento sin aplicación de inoculantes y los inoculados.

Para el cálculo de estos indicadores, se utilizó como información básica la ofrecida en la tabla 5.

**Tabla 5: Costos del establecimiento de la leguminosa y de la aplicación de inoculantes.**

Indicador	Unidad	Valor	Referencia
Depreciación del pastizal de brachiaria	CUP ha <sup>-1</sup> año	126.40	Ver anexo 2
Precio de semilla de estilósante	CUP kg <sup>-1</sup>	49.78	MINAG, 2014
Precio del inoculante micorrízico EcoMic <sup>®</sup>	CUP kg <sup>-1</sup>	8.00	Ficha de Costo EcoMic <sup>®</sup> INCA (2015)
Precio del inoculante de rizobio Azofert <sup>®</sup>	CUP dosis <sup>-1</sup>	34.00	Ficha de Costo Azofert <sup>®</sup> INCA (2015)

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



#### IV. Resultados y discusión

##### 4.1 Experimento 1: Coinoculación de aislados de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular en *Stylosanthes guianensis*

###### 4.1.1 Variables fúngicas del estilosante

Se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) para las variables fúngicas del estilosante (Tabla 6). La inoculación de *F. mosseae* incrementó la frecuencia e intensidad de la colonización y número de esporas, lo que corroboró la efectividad de esta cepa para alcanzar niveles de ocupación radical mayores que los HMA residentes (Ramírez *et al.*, 2006), al menos en las condiciones de este experimento.

**Tabla 6. Efecto de los tratamientos en las variables fúngicas del estilosante.**

Tratamientos		Variables fúngicas		
Rizobios	HMA	Frecuencia (%)	Intensidad (%)	# esporas/50 g
NI	NI	29.50 c	1.35 c	189 c
Sty-1	NI	31.28 c	1.35 c	220 c
Sty-2	NI	32.50 c	1.32 c	217 c
Sty-3	NI	31.15 c	1.35 c	217 c
NI	I	49.35 b	2.46 b	410 b
Sty-1	I	48.50 b	2.48 b	414 b
Sty-2	I	59.00 a	2.84 a	517 a
Sty-3	I	59.83 a	2.85 a	511 a
EE±		1.35*	0.03*	3.85*

Sty-1, Sty-2 y Sty-3: aislados de rizobio inoculados; HMA: cepa de hongo micorrízico arbuscular *Funneliformis mosseae*; NI: no inoculado; I: inoculado con *F. mosseae*. EE (error estándar). abc: Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para  $*P < 0.05$  (Duncan 1955).

El hecho de que los HMA residentes no hayan mostrado valores de estos indicadores similares a los de la cepa introducida puede relacionarse con lo planteado por Miranda *et al.* (2005), quienes aseguran que la eficiencia de la

inoculación de HMA para promover el crecimiento de las plantas, depende de su capacidad para competir con los HMA nativos. Esto se relaciona con la infectividad de la cepa, su capacidad para producir hifas externas, la velocidad de la hifa para colonizar las raíces y su habilidad para mantener niveles de colonización en condición competitiva.

En estas variables, al combinarse esta cepa de HMA con las cepas de rizobios Sty-2 y Sty-3, se constataron diferencias significativas con respecto a las cepas inoculadas por separado. Similares resultados alcanzó Tamayo (2014), quien al coinocular cepas de *Rhizobium* y hongos micorrízicos en *Canavalia ensiformis* (L), encontró que la mejor combinación en la condición edáfica utilizada fue la cepa *R. intraradices* con la cepa denominada Can 5 de la rizobacteria, donde se alcanzaron los mayores valores de frecuencia e intensidad de colonización por el hongo, entre otros indicadores. También, Parra (2012) en estudios realizados sobre el efecto de *Rhizobium* y micorrizas arbusculares en el desarrollo de *Cajanus cajan* en suelos naturales de la localidad de Espino, en el estado Guárico de Venezuela, informó que los valores más altos de intensidad y frecuencia de colonización micorrízica, fueron encontrados en los tratamientos con la combinación de ambos microorganismos, en comparación con los demás tratamientos donde se aplicaron por separado.

El proceso de fijación de  $N_2$  llevado a cabo a través de la simbiosis rizobio-leguminosa es gran consumidor de energía en forma de ATP (Adenosin trifostato), por lo que la planta requiere de un suministro mayor del elemento fósforo, por ser este un componente fundamental de dicha molécula. Si se tiene en cuenta que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) juegan un papel clave en la adquisición de dicho elemento, siendo el suelo donde se desarrolló el estudio deficiente del mismo, se puede inferir que el hongo necesitó de un mayor desarrollo de sus estructuras para lograr poner a disposición de la planta el P y otros nutrientes requeridos adicionalmente, con respecto a los tratamientos donde no se coinocularon ambos organismos.

#### 4.1.2 Efectividad de la nodulación del estilosante

Los aislados de rizobios Sty-2 y Sty-3 produjeron una mayor nodulación al estilosante, aunque la mayor efectividad de sus nódulos se alcanzó cuando se combinaron con *F. mosseae*, exhibiendo valores superiores al 95 % (Tabla 7). Estos resultados coinciden con los alcanzados por Tajini *et al.*, 2012, quienes observaron que la nodulación del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) genotipo Flamingo inoculado con una cepa de rizobio se vió favorecida cuando se utilizó además una cepa de *R. intraradices*. También Nautiyal *et al.* (2010) encontraron que al coinocular rizobios y HMA en *Cicer arietinum* L. aumentó el número y el peso seco de los nódulos por planta.

**Tabla 7. Efecto de los tratamientos en la nodulación del estilosante.**

Tratamientos		Nodulación	
Rizobios	HMA	Nódulos/planta	Nódulos efectivos (%)
NI	NI	14 c	38 d
Sty-1	NI	19 c	41 d
Sty-2	NI	32 ab	66 c
Sty-3	NI	31 ab	89 b
NI	I	15 c	40 d
Sty-1	I	22 c	42 d
Sty-2	I	40 a	98 a
Sty-3	I	39 a	96 a
EE±		2.51*	1.88*

Sty-1, Sty-2 y Sty-3: aislados de rizobio inoculados; HMA: cepa de hongo micorrízico arbuscular *Funneliformis mosseae*; NI: no inoculado; I: inoculado con *F. mosseae*. EE (error estándar). abc: Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para \*P < 0.05 (Duncan 1955).

Se sabe la importancia que tiene el elemento fósforo para el correcto funcionamiento de la FBN. Tajini *et al.*, (2012), concluyeron en su trabajo que adecuadas combinaciones de HMA y rizobios, puede incrementar el crecimiento

de las plantas y la eficiencia del uso del P, mejorando la fijación de N<sub>2</sub> en condiciones de suministro limitado de P.

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

Los HMA aportan ciertos beneficios a la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN), no solo al aumentar la disponibilidad de P en el suelo sino, además, al resolver la escasez de otros nutrientes que podrían limitar la actividad del rizobio (Smith, 2002).

Teniendo esto en cuenta, en el presente experimento, el aumento de la efectividad de la nodulación, estuvo relacionado probablemente con los beneficios del hongo inoculado.

#### **4.1.3 Efecto de los tratamientos en las concentraciones de N, P y K en la biomasa de la parte aérea del estilósante**

Las concentraciones de N se incrementaron con los aislados de rizobios Sty-2 y Sty-3, pero los mayores tenores se alcanzaron al combinar estos aislados con *F. mosseae* (tabla 8). Similares resultados obtuvieron Crespo-Flores *et al.* (2012) y González *et al.* (2012), al utilizar cepas de rizobios y HMA inoculadas de forma independiente y combinadas en otras leguminosas forrajeras como *Teramnus labialis* y *Pueraria phaseoloides* respectivamente. El aumento de las concentraciones de N en la biomasa del estilósante pudiera estar relacionado principalmente con el aumento de la efectividad de los nódulos, aunque también pudo haberse incrementado la absorción de este elemento a través de la red de micelios del hongo inoculado. Esto parece indicar que la simbiosis tripartita rizobio-HMA-planta contribuyó a mejorar la nutrición nitrogenada del estilósante, potenciando su efecto mediante el complemento de los beneficios de ambos microorganismos (Fernández, 2012; Filho, 2004).

A través de la fijación biológica del N<sub>2</sub> que se realiza mediante la simbiosis entre rizobios-leguminosas ocurre un enriquecimiento de la rizósfera, lo cual permite el beneficio de otras especies que coexisten en la zona o sus alrededores. También

se ha demostrado que los HMA pueden incrementar las concentraciones de este elemento en las plantas, a las que es trasladado desde la rizósfera a través de su sistema de hifas (Barea, 2009).

Las concentraciones de P en la biomasa fueron mayores en los tratamientos donde se inoculó *F. mosseae* (Tabla 8). Esto confirma la función de los HMA en la mejora de la nutrición fosfórica de las leguminosas forrajeras, aspecto constatado también por de Miranda *et al.* (2008) y Carneiro *et al.* (2010), al inocular cepas de HMA en estos cultivos.

También Tajini y Drevon (2012), al inocular con tres especies de micorrizas (*Glomus intraradices*, *Gigaspora rosea* y *Acaulospora mellea*) y un aislado de rizobio, observaron los altos niveles de fósforo alcanzados en la biomasa del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), principalmente en las dos primeras. Los propios autores plantean que las combinaciones adecuadas de hongos MA y rizobios, siempre que exista compatibilidad entre ambos simbioses, pueden aumentar el crecimiento de las plantas y la eficiencia del uso del P, mejorando la fijación de N<sub>2</sub> en condiciones de suministro P limitados.

La escasa disponibilidad de fósforo en el suelo ocurre con frecuencia en regiones geográficas de los trópicos y está condicionada, principalmente, por la roca originaria del suelo y su valor de pH. En estas condiciones, la disponibilidad del P es insuficiente para el buen desarrollo de las plantas debido a su alta capacidad de fijación, lo cual provoca un rápido agotamiento del elemento en la zona de crecimiento radical (Brady, 1984; Gianinazzi - Pearson y Gianinazzi, 1983, citados por Rivera *et al.*, 2003).

El suelo donde se desarrolló el presente experimento posee características ácidas (pH = 4.7), por lo que la baja disponibilidad de este elemento ( $P_2O_5 = 2.2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) puede deberse, en gran medida, a su inmovilización a causa de este factor, el cual condiciona la formación de fosfatos de hierro  $Fe_2(OH)_3 PO_4$  y aluminio  $Al_2(OH)_3 PO_4$ .

En estos casos, los HMA asumen un papel determinante en la supervivencia de diversas especies vegetales, pero sobre todo en aquellas incapaces de absorber formas menos móviles de este elemento (Atul-Nayyar *et al.*, 2009). De esta manera, aumentan los sitios de absorción con mayor afinidad por el P, haciéndolo más accesible a las plantas (Rieger y Moreira, 2013).



Se sabe que los hongos micorrizógenos juegan un papel vital en la toma de este elemento en estas condiciones (Harley y Smith, 1983; Trimble y Knowles, 1995, citado por Rivera *et al.*, 2003), atribuyéndose este fenómeno a la capacidad de las hifas de explorar un mayor volumen de sustrato con mayor eficiencia que el sistema radical por sí solo, posibilitando absorber nutrientes de fuentes minerales y orgánicas no disponibles para las plantas (Govindarajulu *et al.*, 2005; Covacevich *et al.*, 2006; Leigh *et al.*, 2009).

**Tabla 8. Efecto de los tratamientos en las concentraciones de N, P y K en la biomasa aérea del *S. guianensis*.**

Tratamientos		Concentración de nutrientes (%)		
Rizobios	HMA	N	P	K
NI	NI	2.62 d	0.19 b	1.28
Sty-1	NI	2.68 d	0.2 b	1.28
Sty-2	NI	3.55 b	0.19 b	1.28
Sty-3	NI	3.61 b	0.2 b	1.28
NI	I	3.16 c	0.25 a	1.29
Sty-1	I	3.17 c	0.25 a	1.29
Sty-2	I	4.00 a	0.24 a	1.29
Sty-3	I	3.99 a	0.25 a	1.28
EE±		0.08*	0.07*	0.01

Sty-1, Sty-2 y Sty-3: aislados de rizobio inoculados; HMA: cepa de hongo micorrizico arbuscular *Funneliformis mosseae*; NI: no inoculado; I: inoculado con *F. mosseae*. EE (error estándar). abc: Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para \*P < 0.05 (Duncan 1955).

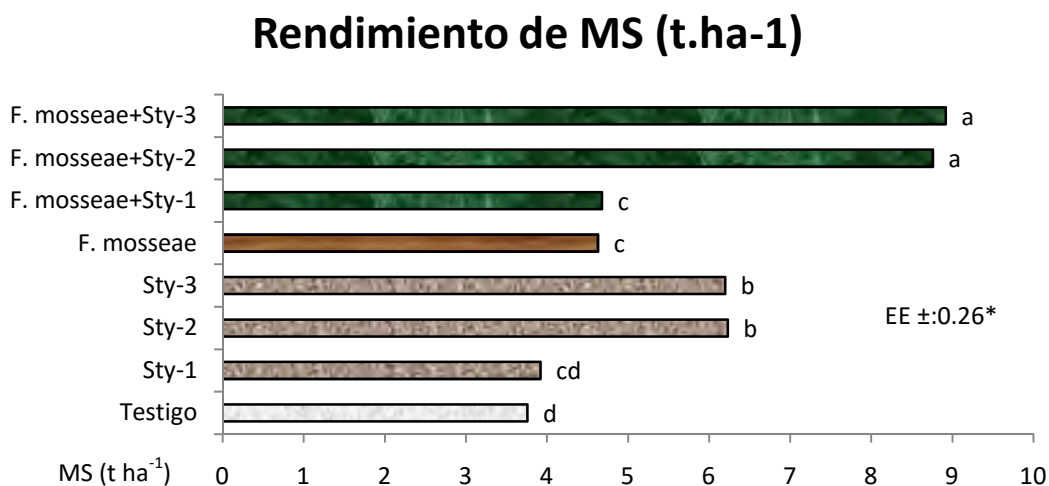
No hubo diferencias entre los tratamientos en cuanto a las concentraciones de K en la MS del estilósante (Tabla 8). Parece ser, que la demanda de este elemento por dicha especie de leguminosa es baja, lo cual se refleja en los estudios realizados por Tomei *et al.*, (1999) y Tomei *et al.* (2003), quienes al evaluar

deficiencias de distintos elementos en suelos diferentes, no encontraron respuesta al K en ninguna de las dos cosechas realizadas para *S. guianensis*, a pesar del bajo contenido de K en el suelo. Tampoco Carneiro *et al.* (2010) encontraron variación en los contenidos de K en la biomasa de *S. guianensis* con 120 días de sembrado para ninguno de los tratamientos, al emplear *G. clarum*, cepas residentes reinoculadas y cuatro dosis de P.

Al parecer el potasio presente en el suelo, a pesar de no ser abundante, fue suficiente para garantizar una nutrición potásica adecuada para el cultivo, o al menos para no manifestar su deficiencia o afectar los indicadores estudiados.

#### 4.1.4 Efecto de los tratamientos en el rendimiento de MS del estilósante

El rendimiento de MS del estilósante se comportó de manera similar a los contenidos de nitrógeno en la biomasa. La inoculación de los aislados de rizobio Sty-2 y Sty-3 produjeron mayor rendimiento que el testigo sin inocular, el inoculado solo con HMA y que los tratamientos inoculados con Sty-1; sin embargo, lograron ser también más efectivas al combinarse con *F. mosseae* (Figura 2).



**Figura 2. Efecto de los tratamientos en el rendimiento de MS de la biomasa aérea de *S. guianensis*.** Sty-1, Sty-2 y Sty-3 (cepas de rizobios), EE (error estándar). abc: Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para \*P < 0.05 (Duncan 1955).

Estos resultados coinciden con los informados por Karti (2009), quien observó que las especies forrajeras *Pueraria phaseoloides* y *Centrosema pubescens* produjeron mayores rendimientos de biomasa con la utilización combinada de fertilizantes biológicos basados en HMA y bacterias del género *Rhizobium*, con respecto a la utilización independiente de cada uno de ellos. También en este indicador, como en el caso del contenido de N en la parte aérea de las plantas, Crespo-Flores *et al.* (2012) y González *et al.* (2012), obtuvieron resultados similares al utilizar cepas de rizobios y HMA, inoculadas de forma independiente y combinadas en *Teramnus labialis* y *Pueraria phaseoloides* respectivamente.

Rabie *et al.* (2005) y Tajini y Drevon (2012) plantearon que los beneficios de la simbiosis tripartita bacteria-HMA-leguminosa, relacionados con el proceso de nodulación de las bacterias nitro fijadoras y el establecimiento de las micorrizas arbusculares, podrían ocurrir simultánea y sinérgicamente, de modo que mientras los hongos movilizan el P y otros nutrientes desde el suelo, las bacterias abastecen de N, no solo a la planta, sino también a los HMA.

También se comprobó la relación directa que existe entre la presencia en la rizósfera de ambos microorganismos y los rendimientos de algunos cultivos, en dependencia de su efectividad, no solo de la eficiencia de ambos microorganismos, sino también en la compatibilidad entre simbioses y hospederos (Castillo *et al.* 2008; Sarabia *et al.* 2010).

Al integrar los resultados del presente experimento, se evidenció el efecto sinérgico importante que se estableció entre los aislados de rizobio y *F. mosseae*, los cuales mejoraron la efectividad de la nodulación y la formación de estructuras fúngicas en las plantas. También produjeron incrementos de las concentraciones de N y P en la biomasa aérea, así como en el rendimiento del estilósante. Al parecer, los beneficios de la interacción de estos microorganismos, en el caso de los aislados de rizobios Sty-2 y Sty-3 y la especie de HMA *F. mosseae*, desempeñaron una función fundamental en el crecimiento y el establecimiento de la leguminosa debido a un mejor aprovechamiento de los nutrientes del suelo, aspecto que coincide con lo encontrado por Sarabia *et al.* (2010).

A partir de los resultados obtenidos en este experimento se decidió evaluar la coinoculación de *S. guianensis* con los aislados de rizobio Sty-2 y Sty-3 y la

especie de HMA *F. mosseae*, en su establecimiento en un pastizal de gramínea (*Brachiaria decumbens*).

## **4.2 Experimento 2. Establecimiento de *Stylosanthes guianensis* vc. CIAT-184 coinoculado con rizobios y *F. mosseae* en un pastizal de *Brachiaria decumbens***

### **4.2.1 Influencia de los tratamientos en las variables fúngicas de las plantas que conforman el pastizal y en la nodulación del estilósante**

En la tabla 9 se muestra el efecto de los tratamientos en las variables fúngicas de las plantas que conforman el pastizal, en las que se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Con la coinoculación se presentaron los mayores valores de frecuencia, intensidad de colonización y contenido de esporas con respecto a los tratamientos no inoculados. Los resultados muestran estrecha relación con los obtenidos en el experimento anterior, donde se alcanzaron los mayores valores utilizando las mismas combinaciones de cepas de rizobios y *F. mosseae*.

Luego de que *F. mosseae* colonizara las raíces del estilósante y se estableciera la simbiosis, puede haber colonizado también las raíces de la brachiaria asociada mediante la expansión de sus hifas. La gramínea, al estar ya establecida cuando se introdujo la leguminosa, seguramente ya estaba colonizada por especies de HMA residentes, no obstante, la especie introducida pudo haber tenido también la oportunidad de colonizar nuevas raíces o simplemente sus espacios libres. Esto último pudo haber sido favorecido debido a que antes de la introducción de la semilla del estilósante, fue efectuado un pastoreo profundo con el objetivo de disminuir la altura de la brachiaria. Al ocurrir el rebrote de la gramínea también tiene lugar el crecimiento de nuevas raíces (Hernández *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2013), las cuales pudieron haber sido colonizadas por la cepa de *F. mosseae*, teniendo en cuenta que el hongo fue introducido a través de la semilla del estilósante, casi al mismo tiempo en que dichas raíces estaban emergiendo.

**Tabla 9. Efecto de los tratamientos en las variables fúngicas de la asociación.**

Tratamientos	Frecuencia (%)	Intensidad (%)	# esporas/50g
<i>B. decumbens</i>	9.77 c	0.94 c	285.8 c
<i>B. decumbens</i> - <i>S. guianensis</i> (asociación)	14.77 b	1.16 b	310.0 b
Asociación + HMA + Sty-2	33.01 a	1.58 a	456.6 a
Asociación + HMA + Sty-3	32.90 a	1.59 a	449.2 a
EE±	0.34*	0.03*	6.09*

HMA (cepa de hongo micorrízico arbusculares), Sty-2 y Sty-3 (aislados de rizobios), EE (error estándar). abc: Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para \*P < 0.05 (Duncan 1955).

Estos resultados corroboran los alcanzados por Ramírez *et al.*, (2006), quienes demostraron en condiciones edáficas similares a las de este experimento la efectividad de *F. mosseae* para alcanzar niveles de ocupación radical mayores que los HMA residentes.

No obstante, el tratamiento donde se asoció el estilósante con la brachiaria, pero sin inocular, también mostró mayores valores de estas variables con respecto al testigo. Esto se puede explicar por el hecho de que la introducción de otras plantas en el pastizal aumenta el número de raíces en la rizósfera y con ello se presentan mayor número de sitios a colonizar por los HMA, teniendo en cuenta, además, que esta leguminosa se considera como de alta dependencia micorrízica según Souza *et al.* (2000).

Los mayores valores de los parámetros fúngicos analizados también pudieron haber sido influidos por la presencia de los aislados de rizobios inoculados, al tener estos una marcada influencia en el desarrollo de dichos hongos, a través de la producción de compuestos flavonoides y exudados emitidos por las células radicales, que facilitan la penetración de sus hifas y posibilita así el beneficio

mutuo entre microsimbionte y macrosimbionte (Gryndler, 2000; Riera y Medina, 2005).

También se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos en la nudulación del estilosante (Tabla 10). Al igual que en el experimento anterior, con la combinación de los aislados de rizobios Sty-2 y Sty-3 con *F. mosseae* se obtuvo mayor nudulación y efectividad de los nódulos con respecto a los demás tratamientos. Esto corrobora que ambos aislados fueron más efectivos para el estilosante que los rizobios residentes en el suelo, las cuales infestaron a las plantas del tratamiento no inoculado mostrando valores inferiores de estas variables (23 nódulos /planta y 47 % de efectividad).

El número de nódulos por planta en este caso (53-57) fue algo inferior al experimento anterior, debido probablemente a la época del año en que se muestrearon las plantas. En este período (diciembre-enero) tiene lugar la floración y producción de semillas y la planta moviliza sus reservas hacia la formación de las flores y frutos, lo que provoca que disminuya o cese el transporte de carbohidratos hacia los nódulos (López *et al.*, 1983 y Bécquer *et al.*, 2012).

No obstante, la efectividad de los nódulos fue similar (89 - 92 %) en ambos experimentos.

**Tabla 10. Efecto de los tratamientos en la nodulación del estilosante.**

Tratamientos	# de nódulos/ planta	Efectividad (%)
<i>B. decumbens</i> - <i>S. guianensis</i> (asociación)	23 b	47 b
Asociación + HMA + Sty-2	57 a	92 a
Asociación + HMA + Sty-3	53 a	89 a
EE±	1.92*	0.62*

HMA (cepa de hongo micorrízico arbusculares), Sty-2 y Sty-3 (aislados de rizobios), EE (error estándar). abc: Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para  $*P < 0.05$  (Duncan 1955).

#### 4.2.2 Influencia de los tratamientos en las concentraciones de PB, P y K en la biomasa aérea de los pastos

La introducción de la leguminosa aumentó significativamente la concentración de proteínas (PB) en la biomasa de la asociación de plantas (Tabla 11). El mayor contenido de PB de las leguminosas con relación a las gramíneas, determinó que este indicador fuera mayor en los tratamientos de asociación con respecto a la brachiaria en monocultivo, ya que la presencia del estilósante en el momento de muestreo fue de 17,72 % para el tratamiento sin inocular y de 27.74 % y 25.72 % para los tratamientos coinoculados. Esto corrobora los resultados de Romero y González (1999) quienes reportaron incrementos de 15.5 % de proteína total en la pradera asociada *B. decumbens* + *A. Pintoi*, comparado con *B. decumbens* en monocultivo.

Además, los datos revelaron mayores valores de este indicador en los tratamientos coinoculados, diferenciándose significativamente de los demás. Este aumento pudo estar relacionado con el aumento de la efectividad de los nódulos en las raíces del estilósante. La misma combinación de cepas utilizada en este experimento fue con la que se obtuvieron los mayores valores de PB en el follaje del *S. guianensis* en el experimento precedente.

**Tabla 11. Efecto de los tratamientos en las concentraciones de PB, P y K de la biomasa aérea de la asociación.**

Tratamientos	PB	P	K
	(%)		
<i>B. decumbens</i>	6.85 c	0.11 c	1.12 c
<i>B. decumbens</i> - <i>S. guianensis</i> (asociación)	9.87 b	0.16 b	1.44 b
Asociación + HMA + Sty-2	12.43 a	0.21 a	1.59 a
Asociación + HMA + Sty-3	12.53 a	0.21 a	1.60 a
EE±	0.14*	0.008*	0.041*

HMA (cepa de hongo micorrízico arbusculas), Sty-2 y Sty-3 (aislados de rizobios), EE (error estándar). abc: Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para \*P < 0.05 (Duncan 1955).

Aunque en este experimento no se determinó la concentración de PB en la gramínea asociada, su valor pudo haberse incrementado debido a la cercanía de sus raíces con las de la leguminosa. Esto pudiera atribuirse al traslado de este elemento hacia las plantas, por las hifas de los HMA, ya que el enriquecimiento que se produce en la rizósfera a través de la fijación biológica del N<sub>2</sub> beneficia a las otras especies que coexisten en la zona o sus alrededores (Barea, 2009).

Al respecto Tajini y Drevon (2012), encontraron un incremento del contenido de N en la biomasa del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) al utilizar cepas de HMA junto a un aislado eficiente de rizobio; en este caso se demostró que la colonización de las raíces del frijol por los HMA fue realizada tanto mediante la inoculación de estos microorganismos como por contacto con las raíces de plantas de *S. guianensis* inoculadas asociadas al cultivo.

El fenómeno anterior había sido encontrado también por Giller y Cadisch, (1995), quienes indicaron que, debido a la capacidad de fijación de N atmosférico de la mayoría de las leguminosas, ellas pueden aportar este elemento al sistema suelo-planta-animal, lo que posibilita suplir o minimizar la necesidad de fertilización con portadores de N para favorecer a las gramíneas (Almeida *et al.*, 2003).

Los tratamientos inoculados con la cepa de HMA también favorecieron las concentraciones de P en la biomasa de la asociación. La inoculación del estilósante con *F. mosseae*, incrementó el contenido de fósforo significativamente ( $P < 0.05$ ) con respecto al tratamiento de asociación no inoculado (Tabla 11). Estos resultados coinciden con los encontrados en el experimento anterior y corroboran la efectividad de la inoculación de HMA para mejorar la nutrición fosfórica de los cultivos (Carneiro *et al.*, 2010).

La fuerte demanda de P en el proceso de fijación simbiótica del nitrógeno hace a las leguminosas dependientes de suministros adecuados de este elemento al suelo (Pinto *et al.*, 2002). Al respecto Tajini y Drevon, (2012), plantearon que combinaciones adecuadas de HMA y rizobios compatibles entre ellos, pueden favorecer, además del crecimiento de las plantas y la fijación de N<sub>2</sub>, la eficiencia del uso del P, en condiciones de suministro de P limitados.

En el caso del tratamiento de asociación sin inocular, los valores de P también fueron significativamente mayores a los de la brachiaria sin asociar, lo que pudo



haber sido causado por la presencia de la leguminosa en el sistema, ya que estas generalmente incrementan el valor nutritivo del pastizal (Rojas *et al.*, 2005).

En la asociación sin inocular, las especies de HMA residentes debieron colonizar las raíces de las plantas no inoculadas, por lo cual, aunque en menor medida que *F. mosseae*, las mismas pudieron haber favorecido la absorción de P, teniendo en cuenta el bajo contenido de este elemento en el suelo.

En este caso, *S. guianensis* jugó un papel importante, si se tiene en cuenta que es considerada una especie con alta dependencia micorrízica (Souza *et al.*, 2000), lo cual se reflejó en los mayores valores de los parámetros fúngicos de este tratamiento con respecto al conformado solo por *B. decumbens*.

Las concentraciones de K en la masa seca de los pastos, difirió significativamente entre los tratamientos. Así, el valor de este elemento fue mayor en los pastos asociados que en el monocultivo de la gramínea (Tabla 11). A su vez, con la inoculación del estilósante con ambos microorganismos las concentraciones de este elemento en la biomasa de la asociación fueron mayores.

Esto contrasta con lo encontrado en el experimento anterior a pesar de que se condujeron en suelos con similares contenidos de K. Los valores más altos de este elemento en la biomasa de la asociación en el presente experimento puede deberse a que la brachiaria se benefició de la leguminosa asociada y de los microorganismos inoculados con ella, principalmente por la cepa de HMA, que colonizó también sus raíces.

Este planteamiento concuerda con lo explicado anteriormente en el caso del P, al referirse Barea (2009) al beneficio que reciben las plantas asociadas a otras micorrizadas, en cuanto a la adquisición de nutrientes mediante la red de hifas de los HMA.

El contenido de K más alto en la asociación (aún sin la aplicación de los inoculantes) pudo deberse a la estimulación del N fijado biológicamente por las raíces de la leguminosa, que influyó en la mayor absorción de N por la gramínea, lo que incrementó el rendimiento de esta planta y su consiguiente aumento en la extracción de K del suelo (Costa *et al.*, 2008; Crespo *et al.*, 2015).

Dicho efecto se manifestó mayormente en las asociaciones donde se efectuó la coinoculación con ambos microorganismos. Esto evidencia que la absorción de K en estos casos fue favorecida por los HMA y por la mayor incorporación de N por

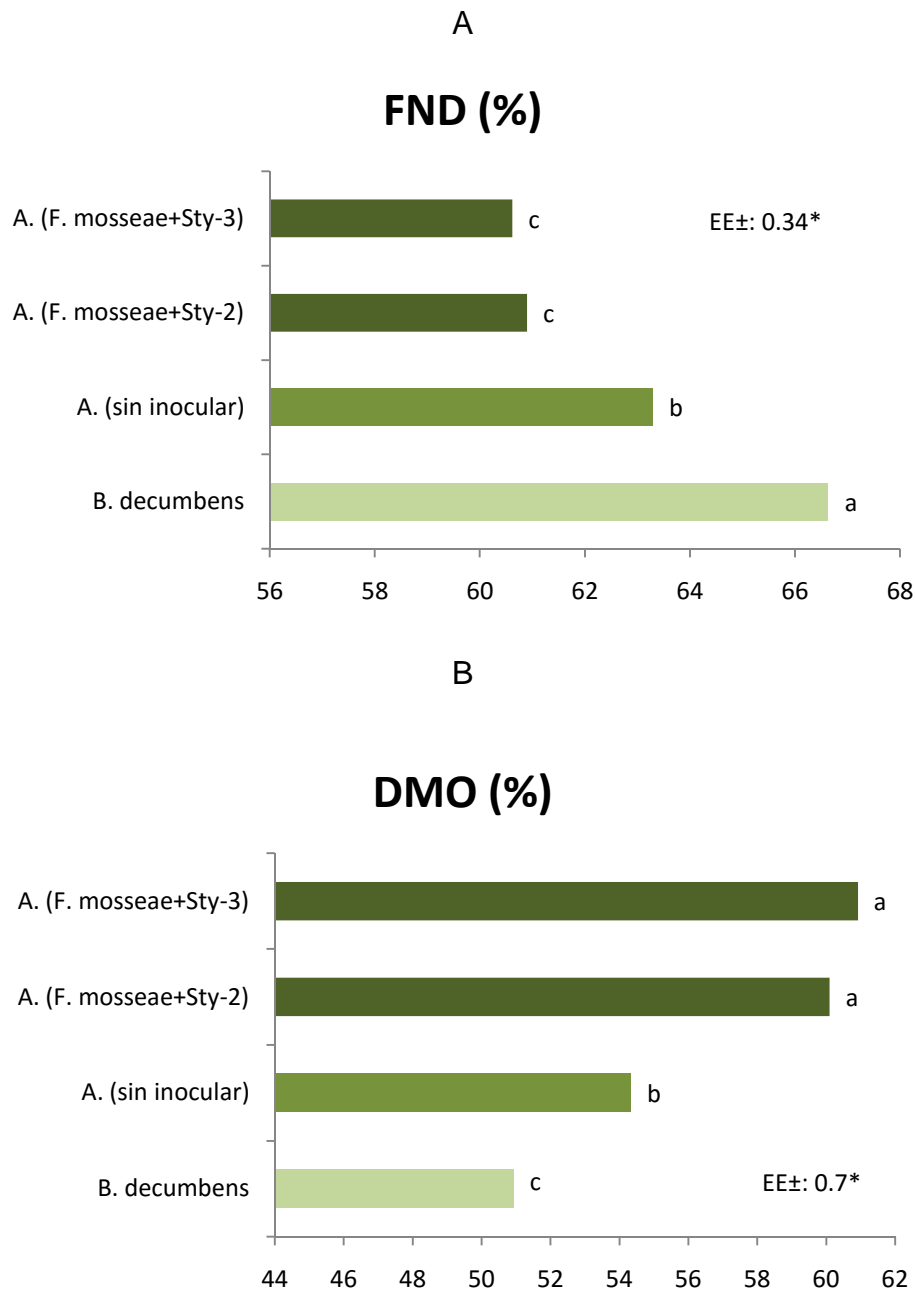
la acción de los rizobios aplicados, lo cual propició una mayor demanda de K en los pastos que conforman la asociación.

#### **4.2.3 Influencia de los tratamientos en los porcentajes de fibra detergente neutra (FND) y la digestibilidad de la materia orgánica (DMO) del forraje**

La FND es la fibra que queda luego de hervir la masa seca del forraje en una solución de detergente neutro (sulfato lauril sódico y ácido etilendiaminotetraacético, EDTA). Durante el proceso todo el contenido celular se disuelve y queda lo que corresponde a la pared celular, o sea que se compone fundamentalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina (Palladino *et al.*, 2006).

Los tratamientos de asociación presentaron valores más bajos de FND con respecto a la brachiaria en monocultivo, a su vez, en presencia de la inoculación los valores de este indicador fueron aún menores (Figura 3 A).

El menor contenido de FND en los tratamientos de asociación fue influenciado por la presencia de la leguminosa en el pastizal, ya que estas generalmente presentan menor porcentaje de FND que las gramíneas, pues contienen menor cantidad de material correspondiente a la pared celular (Veloz, 2004). El aumento de este indicador en los tratamientos donde se coinoculó *F. mosseae* con los aislados de rizobios con respecto a la asociación sin inocular, está dado también por la mayor presencia de la leguminosa en estos tratamientos, lo cual se relaciona con el efecto de estos microorganismos en el aumento del rendimiento de MS del estilosante.



**Figura 3 (A y B). Efecto de los tratamientos en la DMO (A) y la FND (B) de la asociación.** FND (Fibra neutro detergente), DMO (Digestibilidad de la materia seca), A. (asociación *B. decumbens*–*S. guianensis*). Sty-2 y Sty-3 (aislados de rizobios), EE (error estándar). abc: Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para \* $P < 0.05$  (Duncan 1955).

La digestibilidad (DMO) fue mayor en los tratamientos de asociación con respecto a la brachiaria sola (Figura 3 B), corroborando los estudios de González *et al.*

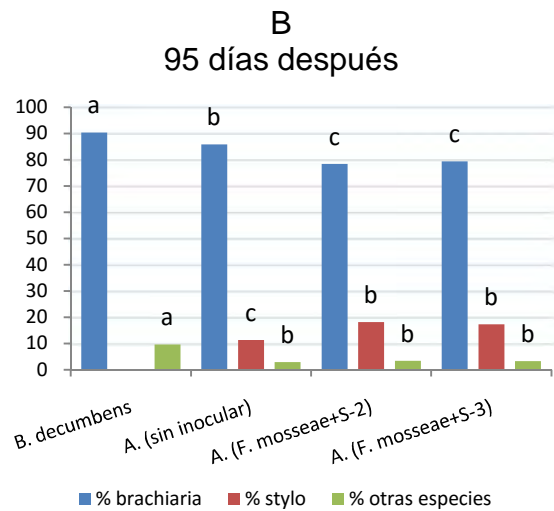
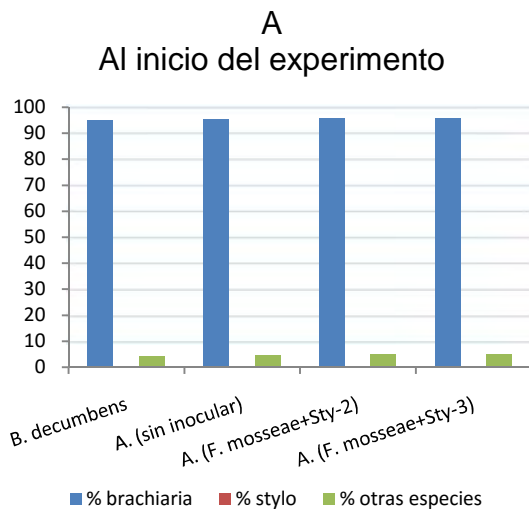
(1996) al evaluar la calidad de forraje en oferta del pasto Estrella solo y asociado con las leguminosas *A. pintoi* CIAT-17434 y *D. ovalifolium* CIAT-350. Entre los tratamientos de asociación, los inoculados fueron los más favorecidos.

Al contrario de la FND, generalmente las leguminosas presentan mayor digestibilidad que las gramíneas. Esto está relacionado con el contenido de PB, por encontrarse este mayormente en el contenido celular, el cual es directamente proporcional a la digestibilidad e inversamente proporcional a la FND.

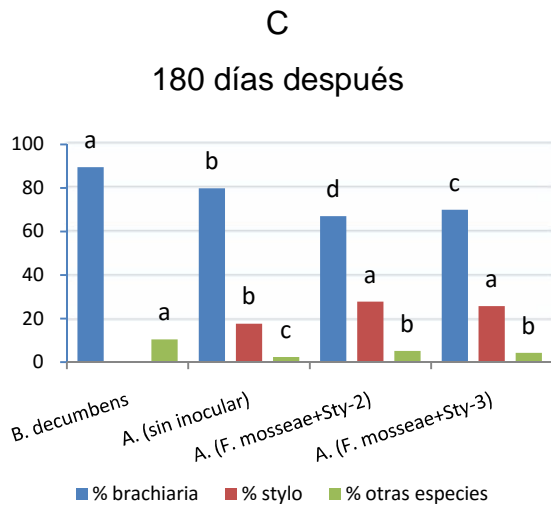
En este sentido, los resultados de estos indicadores parecen estar relacionados con el aumento de la efectividad de la nodulación y de las variables fúngicas que produjo la coinoculación de ambos microorganismos, que a su vez se reflejaron en la presencia de la leguminosa en el pastizal y el mayor contenido de PB encontrado en la biomasa de la asociación coinoculada.

#### **4.2.4 Efecto de los tratamientos en la composición botánica del pastizal**

La composición botánica de la asociación varió significativamente ( $P < 0.05$ ) en función de los tratamientos (Figura 4). A los 95 días después de sembrado (dds) (Fig. 4 B) el estilósante representó entre 17.28 y 18.18 % de la asociación. Pasado los 75 días del muestreo anterior (180 dds) (Fig. 4 C) la misma ascendió entre 25.72 y 27.74 %. En ambos momentos de muestreo pudo observarse que la inoculación del estilósante con ambos microorganismos produjo un incremento en la producción de MS de la asociación (Fig. 5), así como una mayor supervivencia en el medio, lo que permitió que la leguminosa alcanzara una mayor presencia con respecto al tratamiento no inoculado, el cual representó solamente el 11.30 y el 17.72 % en el primer y segundo muestreo, respectivamente. Según Rojas *et al.*, (2005) para obtener el máximo beneficio de la asociación, la disponibilidad de la leguminosa debe estar comprendida entre el 30 y 40 % de la especie en cuestión.



EE±: 0.48\* 0.49\* 0.46\*



EE±: 0.59\* 0.86\* 0.56\*

**Figura 4 (A, B y C): Efecto de los tratamientos en la composición botánica de la asociación.** (A: Al inicio del experimento, B: A los 95 días después de la siembra (dds) y C: 180 dds), Sty-2 y Sty-3 (aislados de rizobios), EE (error estándar), A. (asociación *B. decumbens*–*S. guianensis*).

El hecho de que en el último muestreo realizado, la presencia del estiloso no alcanzó más del 30 %, parece tener relación con la competencia interespecífica que se presenta entre especies de gramíneas asociadas con leguminosas. Aroeira *et al.*, (2005) plantean que el decrecimiento en el porcentaje de la leguminosa en asociación con gramínea puede atribuirse a la competencia por agua, luz y nutrientes en general, y entre plantas de diferentes especies, teniendo en cuenta que las primeras presentan el ciclo de asimilación del carbono denominado C3 y las segundas el C4.

Por otro lado, algunos autores se refieren al efecto alelopático que se le atribuye a la brachiaria que le permite controlar el crecimiento radical de las leguminosas herbáceas y otras especies (Guiot y Meléndez, 2003; Canchila *et al.*, 2010).

A pesar de esto, a través de los distintos muestreos se manifestó un ascenso del porcentaje del estilósante en el pastizal de manera paulatina. Al parecer, la influencia de *F. mosseae* y los aislados de rizobios en conjunto permitió disminuir dicha competencia, coincidiendo paralelamente con las concentraciones de nutrientes encontrados en la masa seca de los pastos. A su vez, el posible efecto alelopático de la brachiaria pudo haber sido reducido a través de la acción benéfica de estos microorganismos, teniendo en cuenta que su interacción con las plantas, provocan en ellas ciertos cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos que la protegen de diversos estreses (Barea y Jeffries, 1995; de la Noval, 2008).

No obstante lo explicado anteriormente, teniendo en cuenta las condiciones en que se realizó este experimento (en seco y la baja fertilidad del suelo), el porcentaje alcanzado por la leguminosa dentro del pastizal puede considerarse aceptable.

#### **4.2.5 Efecto de los tratamientos en el rendimiento de MS de los pastos**

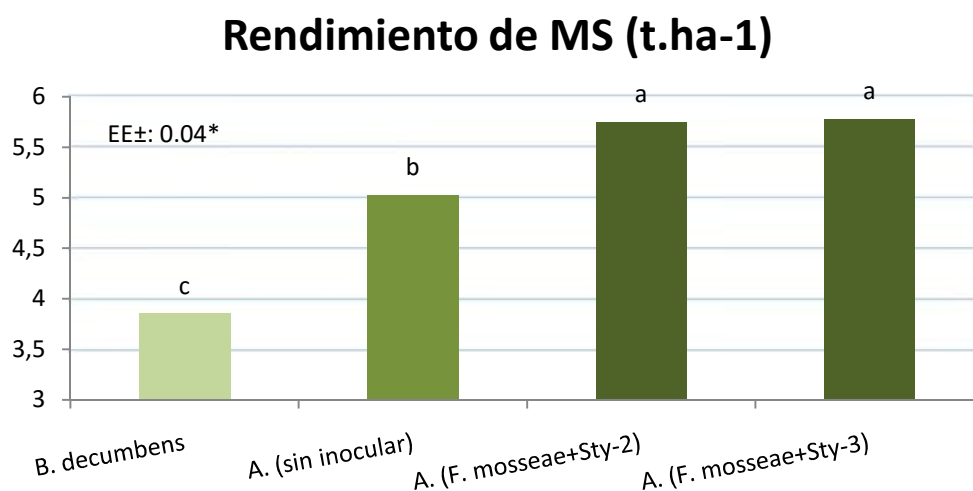
El rendimiento de MS se comportó de manera similar al resto de las variables evaluadas (Fig. 5). La brachiaria en monocultivo produjo menor cantidad de biomasa aérea que cuando se asoció con la leguminosa, lo cual corrobora lo encontrado en los estudios de Silva y Saliba (2007) al evaluar este indicador en asociaciones de brachiarias y leguminosas.

Al introducir leguminosas en un pastizal conformado por gramíneas se produce un incremento en el rendimiento de MS del pastizal (Rojas *et al.*, 2005). El nitrógeno fijado por las leguminosas mediante su simbiosis con rizobios también es absorbido por el sistema radical de la gramínea, lo cual incide en una mayor producción de MS del pasto. Esto es posible por la cercanía entre las raíces de ambas especies, pero fundamentalmente por la conexión entre ellas a través de las hifas de los HMA. También, se sabe que las rizobacterias sintetizan ciertas sustancias promotoras del crecimiento como giberelinas, citocininas y auxinas,

favoreciéndose, además de la leguminosa, las plantas que habitan cerca de ellas (Hernández y Escalona, 2003).

Este proceso se reflejó en mayor magnitud en los tratamientos de inoculación del estiloso con *F. mosseae* y los aislados de rizobios, donde el rendimiento de MS de la asociación fue significativamente ( $P < 0.05$ ) mayor que en el resto de los tratamientos.

Esto demuestra la contribución de la introducción de ambos microorganismos al aumento del rendimiento de MS de la asociación. Con ello se corroboran los resultados del experimento anterior, donde se alcanzó el mayor rendimiento de MS de *S. guianensis* con la inoculación de las mismas cepas utilizadas en este experimento.



**Figura 5. Efecto de los tratamientos en la producción de masa seca de la asociación.** A. (Asociación *B. decumbens*–*S. guianensis*), Sty-2 y Sty-3 (aislados de rizobios), EE (error estándar), abc: Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para  $*P < 0.05$  (Duncan 1955).

La cepa de *F. mosseae*, luego de colonizar las raíces de las plantas inoculadas, al extender sus hifas a medida que exploraban el suelo en busca de nutrientes, pudo haber colonizado también las raíces de la gramínea y establecer la simbiosis, y con ello mejorar su nutrición. Esta mejora en la nutrición genera una mayor producción de MS del pasto aumentando su rendimiento.

Aunque en este experimento fue imposible evaluar las variables fúngicas de cada especie por separado debido a que se cultivaron en una asociación espacial, algunos trabajos demuestran el beneficio de las plantas al asociarse con otras micorrizadas (Tajini *et al.*, 2012).

A pesar de que la leguminosa requiere un suministro adecuado de nutrientes para poder establecerse, sobre todo en asociación con una gramínea considerada agresiva como *B. decumbens*, su interacción con los microorganismos inoculados le permitió producir un mayor desarrollo de sus estructuras micorrízicas y una nodulación efectiva de los rizobios, lo cual incidió en un mayor alcance de los nutrientes y el agua y en un mayor rendimiento de MS y sobrevivencia de las plantas.

Todo esto contribuyó positivamente a lograr un adecuado establecimiento de la leguminosa en el pastizal, mejorando las cualidades nutricionales del mismo y su rendimiento de masa seca, lo que refleja el beneficio de la interacción tripartita entre rizobio-HMA- leguminosa y su aporte en la mejora de las cualidades del pastizal.

En este experimento se demostró que la coinoculación del estilosante con *F. mosseae* y los aislados Sty-2 y Sty-3 influyó positivamente en la producción de MS, la composición botánica y el establecimiento de la asociación estilosante-brachiaria, lo cual estuvo relacionado con un mayor acceso de la leguminosa a los nutrientes del suelo, que se corrobora con un incremento en la nodulación y su efectividad, con el aumento de las variables fúngicas y con los contenidos de nutrientes en la MS de los pastos asociados.

#### **4.3 Consideraciones económicas sobre la coinoculación de hongos micorrízicos arbusculares y rizobios durante el establecimiento de *S. guianensis* en un pastizal de *B. decumbens***

En la tabla 12 se presenta, el comportamiento de los indicadores que contribuyen a la formación de los costos del pastizal durante el período del establecimiento de la asociación de *S. guianensis* con el pasto *B. decumbens*. Como puede observarse, en los tratamientos donde se aplicaron los inoculantes microbianos, si bien el costo total se incrementó en relación con el tratamiento donde la leguminosa no fue coinoculada, el incremento de los rendimientos del pastizal por



efecto de la coinoculación contribuyó a reducir los costos por hectárea de la biomasa producida.

Si bien estos resultados indican que el uso de inoculantes microbianos para mejorar el cultivo de leguminosas forrajeras en pastizales de gramíneas prácticamente no contribuyen al incremento de los costos del pastizal al menos durante la fase de establecimiento de la asociación, no debe excluirse de este análisis los posibles beneficios económicos que pudieran obtenerse con la coinoculación de rizobios y HMA una vez establecida la asociación e introducidos los animales en el pastizal, pues el incremento de los rendimientos y del valor nutritivo de la biomasa, tal como se demostró en este trabajo, mejora considerablemente la dieta de los animales y ello tendría una repercusión directa en los indicadores económicos de la unidad ganadera, al mejorar los indicadores productivos y reproductivos del rebaño (Carvalho y Pires, 2008; Lopes *et al.*, 2011).

**Tabla 12. Valoración económica del establecimiento de la asociación brachiaria-estilosante**

Tratamientos	Depreciación del pastizal de brachiaria (CUP ha <sup>-1</sup> )	Costo semilla estilosante (CUP ha <sup>-1</sup> )	Costo de aplicación del EcoMic (CUP ha <sup>-1</sup> )	Costo de aplicación del Azofert (CUP ha <sup>-1</sup> )	Costo total del establecimiento (CUP ha <sup>-1</sup> )	Rendimiento MS (t.ha <sup>-1</sup> )	Costo de la biomasa del pastizal (CUP t <sup>-1</sup> MS)	Ahorro (CUP t <sup>-1</sup> MS)
<b>2</b>	126.40	398.24	-	-	524.64	5.03	104.30	-
<b>3</b>	126.40	398.24	6.4	5.99	537.03	5.75	93.40	10.9
<b>4</b>	126.40	398.24	6.4	5.99	537.03	5.78	92.91	11.39

**Descripción de los Tratamientos:** **2.** Brachiaria + estilosante; **3.** Brachiaria + estilosante + EcoMic (*F. mosseae*) + Azofert (Sty-2); **4.** Brachiaria + estilosante + EcoMic (*F. mosseae*) + Azofert (Sty-3).

#### **4.4 Consideraciones generales sobre la coinoculación de HMA y rizobios eficientes en el establecimiento de *Stylosantes guianensis***

Los resultados obtenidos permiten integrar aspectos que abordan el tema del manejo de la simbiosis tripartita rizobio-leguminosa-HMA, vía coinoculación, en relación al establecimiento de asociaciones de leguminosas con gramíneas. Se le ha concedido gran importancia tanto a la coinoculación de ambos microorganismos y sus potencialidades para mejorar la nutrición y la productividad de los pastos y otros cultivos, como al establecimiento de dichas asociaciones para mejorar el rendimiento y el contenido nutricional del pastizal y con ello el aumento de la productividad de los animales en pastoreo, sin embargo, según la literatura consultada, aún son escasas las investigaciones que integren estas dos cuestiones.

En esta investigación se demostró primeramente, la importancia de una correcta selección de la cepa de HMA y aislados de rizobios, lo cual constituye un requisito fundamental para lograr establecer una simbiosis tripartita efectiva, cuyo beneficio en el estado nutricional y la productividad de la leguminosa pueda garantizar su establecimiento al asociarse con gramíneas, en función de mejorar el estado nutricional y productividad del pastizal.

Este trabajo corrobora el aumento de la calidad nutricional y el rendimiento de MS que se obtiene con la asociación de gramíneas con leguminosas, debido a las cualidades que presentan estas últimas de poseer mayor contenido de proteínas y otros minerales y una mayor digestibilidad, lo cual podrá incidir en una mejor nutrición de los animales y mayor ganancia de peso vivo.

Sumado a esto, la potenciación de esas cualidades, facilitada por la acción benéfica de los HMA en cuanto a la mejora de la absorción de los nutrientes del suelo, y de los rizobios mediante la fijación biológica del N<sub>2</sub>, tuvieron un papel decisivo en los resultados alcanzados. Esto resulta novedoso, ya que según la literatura consultada, escasean los trabajos en que se recomienda la coinoculación de leguminosas con estos microorganismos para establecerlas en pastizales de gramíneas.

Las combinaciones acertadas de la cepa de HMA y aislados de rizobios eficientes, determinadas en el primer experimento, permitieron el posterior éxito en el establecimiento de *S. guianensis* al asociarlo con *B. decumbens*, lo cual

influyó positivamente en la calidad nutricional del pastizal, así como en su rendimiento, debido a la mayor presencia de la leguminosa.

El logro exitoso del establecimiento de las leguminosas en el pastizal mediante la coinoculación estuvo relacionado, además de los indicadores antes mencionados, con el aumento de las variables fúngicas y del número de nódulos y la efectividad de los mismos. Tales beneficios se explican por la influencia notable de los HMA en el mayor aprovechamiento de los nutrientes por las plantas, y por el nitrógeno adquirido por la leguminosa a través de la simbiosis con los rizobios, el cual también pudo haber sido transferido al sistema.

Los resultados experimentales también demostraron la factibilidad económica de la inclusión de dichos microorganismos al sistema para lograr el establecimiento adecuado de *S. guianensis* y su asociación con *B. decumbens*. Aunque no se emplearon tratamientos de fertilización para cubrir los requerimientos de la leguminosa para lograr su establecimiento, se presume que la variante utilizada puede representar un ahorro de fertilizantes, lo cual fue reflejado en la mayor presencia de estas plantas en el pastizal y en los mayores rendimientos de MS obtenidos de la asociación aún sin la aplicación de fertilizantes.

No obstante, se sabe la necesidad de reponer los nutrientes extraídos del suelo por los cultivos, por lo que en futuros estudios se recomienda evaluar el efecto de aplicaciones de dosis moderadas de portadores de nutrientes conjuntamente con la inoculación de cepas previamente seleccionada de estos microorganismos. Elementos como el P son fijados fácilmente en suelos con características similares al utilizado en estos experimentos, por lo que su eficiencia de absorción por las plantas disminuiría rápidamente a medida que ocurre este fenómeno. La importancia de la utilización de cepas de HMA eficientes para promover el incremento de la productividad de los pastos en este tipo de suelo, radica en garantizar el aprovechamiento más eficiente de esos nutrientes por las plantas.

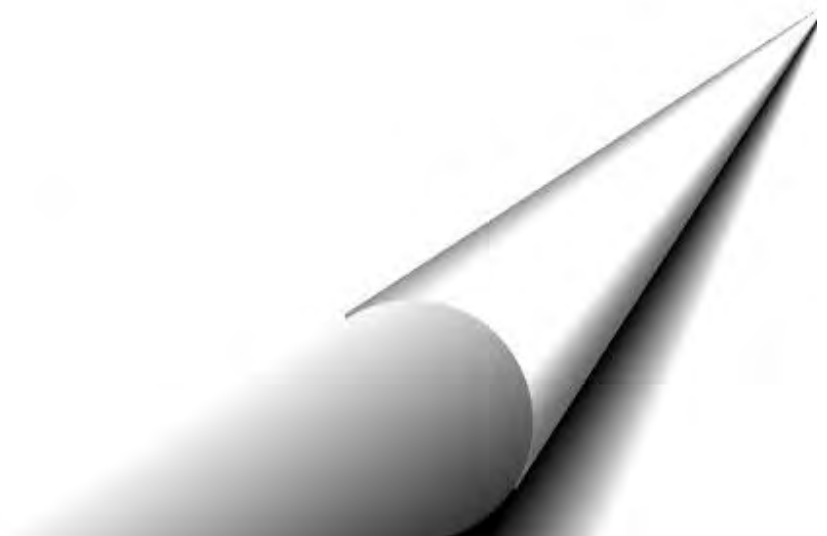
El programa para la Recuperación de la Masa Ganadera que lidera el Ministerio de la Agricultura (MINAG. 2005) se trazó como meta transformar y mejorar 417.8 miles de ha. de pastos y forrajes en los próximos años. A 10 años de este plan, aunque se han incrementado estas áreas, queda mucho por hacer en cuanto a la mejora nutricional de los pastizales.

Mediante este trabajo se avizora que la utilización de biofertilizantes a base de HMA y rizobios, puede ser un camino con buenas perspectivas para implementar

la introducción de leguminosas en sistemas de pastizales, teniendo en cuenta el ahorro de fertilizantes que podría representar, garantizando su establecimiento y su asociación con gramíneas con un menor costo.

Se hace necesario conducir futuras investigaciones sobre mejores métodos de manejo del pastizal que permitan el mantenimiento de un porcentaje adecuado de leguminosas en el sistema.

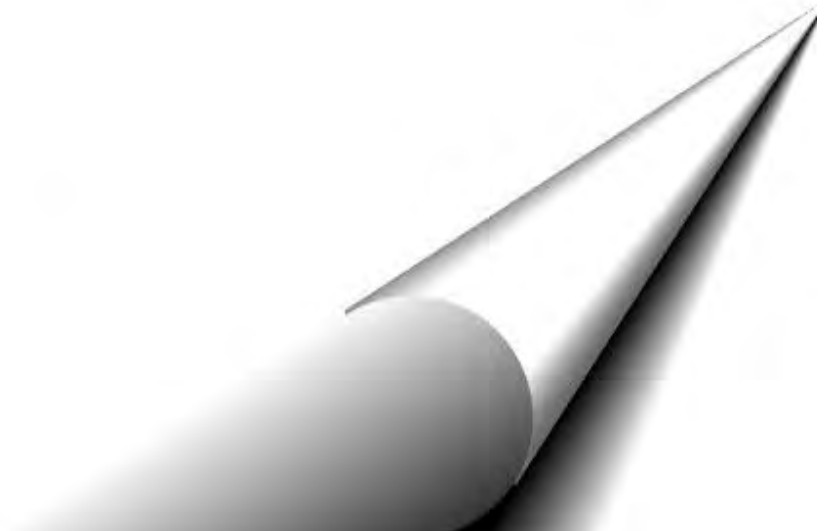
# CONCLUSIONES



## V. Conclusiones

- ❖ Los aislados de rizobios Sty-2 y Sty-3 mejoran la nodulación, el estado nutricional y el rendimiento de *Stylosanthes guianensis*. Ambos aislados resultan más efectivos cuando se combinan con la especie de HMA *Funneliformis mosseae*.
- ❖ La coinoculación de Sty-2 o Sty-3 con *F. mosseae* contribuye al establecimiento de *S. guianensis* en un pastizal de *Brachiaria decumbens*.
- ❖ El rendimiento de MS y el valor nutritivo del pastizal se incrementan con la introducción de *S. guianensis* coinoculado con uno u otro aislado efectivo de rizobio y *F. mosseae*.
- ❖ Se comprueba el efecto sinérgico de bacterias nitro fijadoras y hongos micorrízicos arbusculares, así como la utilidad de la coinoculación de ambos microorganismos para mejorar el establecimiento de leguminosas forrajeras en pastos cultivados de gramíneas y consecuentemente, las ventajas de su presencia en los pastizales.

# RECOMENDACIONES

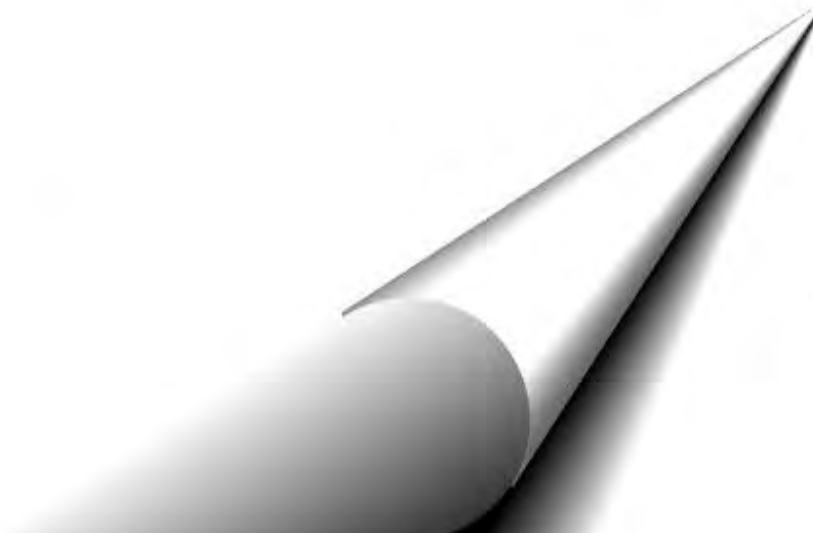




## **VI. Recomendaciones**

- Validar a escala de producción los resultados obtenidos en este trabajo.
- Continuar estos estudios más allá del establecimiento de la asociación, para evaluar la persistencia de la leguminosa y del efecto de su coinoculación con rizobios y HMA en el pastizal.
- Extender el estudio a otros tipos de suelos y especies de leguminosas en monocultivo o asociadas con gramíneas.
- Utilizar los resultados obtenidos en la docencia de pre y postgrado de las ciencias agrícolas.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## VII. Referencias bibliográficas

- Adjei M. B., P. Mislevy, R.S. Kalmbacher and P. Busey 1989. Production, quality, and persistence of tropical grasses as influenced by grazing frequency. Proc. Soil Crop Sci. 48:1-6.
- Akhtar, M. S., Siddiqui, Z. A. 2007. Effects of *Glomus fasciculatum* and *Rhizobium* sp. on the growth and root-rot disease complex of chickpea. Arch. Phytopathol. Plant Protec. 40: 37–43.
- Almeida, R. G., Euclides, V. P. B., Nascimento Júnior, D., Macedo, M. C. M., Fonseca, D. M., Brâncio, P. A., Barbosa, R. A. 2003. Disponibilidade, composição botânica e valor nutritivo de pastos consorciados, sob três taxas de lotação. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 32, p. 36-46.
- Allen, O. N. and Allen. E. K. 1981. The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press, Madison.
- Allen, M. F., Swenson, W., Querejeta, J. I., Egerton-Warburton, L. M., Treseder, K. K. 2003. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 41: 271- 303.
- Amezquita, M. C., Toledo, J. M. and Keller-Grein, G. 1991. Agronomic performance of *Stylosanthes guianensis* cv. Pucallpa in the American tropical rain forest ecosystem. Tropical Grassland (A.C.T). 25(3): 262 - 267.
- Anon. 1986. Progresos de la red nacional de evaluación de pastos tropicales en México. Pasturas tropicales.8 (3):26.
- Antoun, H. & Prévost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Ed. Z. A. Siddiqui. The Netherlands. Pp. 1-38.
- AOAC. 1995. Official Methods and Analysis. 16<sup>th</sup> Ed. Washington, U.S.A. Ed. Of Agric. Chem. Sp.
- Arias, K., Ruiz, C., Milla, M., Fabio, H. & Escobar, A. 2001. Almacenamiento de Carbono por *Gliricidia sepium* en sistemas agroforestales en Yaracuy, Venezuela. Livest. Res. Rural Develop. 13:5.177p.

- Arias, A. & Hernández, H. 2002. Composición química del pasto aguja (*Brachiaria humidicola*) sometida a pastoreo en una finca del municipio Guanares estado Portuguesa. *Revista Científica*. Universidad de Los Andes. Vol. XII, Suplemento II.
- Argel, J. P. 1996. Contribución de las leguminosas forrajeras tropicales a la producción animal en sistemas semi-intensivos de pastoreo. Pastoreo intensivo en zonas tropicales. Primer Foro Internacional. Banco de México. FIRA. Veracruz, México del 7 al 9 de Noviembre.
- Argel, P., Villarreal, M. 1998. Nuevo maní forrajero perenne (*Arachis pintoi* Krap. y Greg. nom. mud.) (CIAT-18744): leguminosa herbácea para alimentación animal, el mejoramiento y conservación del suelo y el embellecimiento del paisaje. San José: Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. 23p.
- Aroeira, L. J. M., Paciullo, D. S. C., Lopes, F. C. F., Morenz, M. J. F., Saliba, E. S., da Silva, J. J. e Ducatti, C. 2005. Disponibilidade, composição bromatológica e consumo de materia seca em pastagem consorciada de *Brachiaria decumbens* com *Stylosanthes guianensis*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.40, n.4, p. 413 - 418, abr.
- Arrese - Igor, C., Royuela, M., de Lorenzo, C., de Felipe, M. R., Aparicio – Tejo, P. M. 1993. Effect of low rhizosphere oxygen on growth, nitrogen fixation and nodule morphology in lucerne. *Physiol Plant* (in press).
- Atul-Nayyar, A., Hamel, C., Hanson, K., Germida, J. 2009. The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. *Mycorrhiza*. 19 (4): 239 - 246.
- Barea J. M, Jeffries P. 1995. Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems. En: *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*, Ed. Varma, A, and Hock, B. Heidelberg: Springer. p. 521 – 559.
- Barea, J. M. (1997). Mycorrhiza - bacteria interactions on plant growth promotion. In: Ogoshi K et al. (eds) *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, Paris, OECD Press, pp. 150 - 158.

- Barea, J. M., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Anton. Van. Leeuwen*, 81: 343 - 351.
- Barea, J. M., Gryndler, M., Lemanceau, P., Schüepp, H; Azcon, R. 2002. The rhizosphere of mycorrhizal plants. In *Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts*. Edited by S. Gianinazzi, H. Schüepp, J. M. Barea and K. Haselwandter. Birkhäuser Verlag, Basel, p: 1-18.
- Barea, J. M., 2009. Mycorrhizas and agricultural fertility. *In: J. Bonilla (ed.), Current Topics in Agriculture*. Editorial Studium Press. USA.
- Bauer, T. 2001. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: familia *Rhizobiaceae*. Disponible en: <http://www.microbiologia.com.ar/suelo/Rhizobium.html>. Consultado en noviembre de 2012.
- Bécquer, C. J., Nápoles, J. A., Álvarez, O., Ramos, Y. y Palmero, L. A. 2012. Comportamiento de la simbiosis leguminosa-rizobio en *Centrosema plumieri* inoculada con *Bradyrhizobium* sp. Ensayo de campo 175. *Pastos y Forrajes*, Vol. 35, No. 2, abril-junio, 175 - 186.
- Berbara, R. L. L., Souza, F. A., Henrique, M. A. C. 2006. III- fungos micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. P: 53 - 85. En: *Nutrição Mineral de Plantas*, SBCS, Viçosa, 2006, (ed. Fernandes, M. S.). 432 p.
- Binder, U. 1997. *Centrosema pubescens*, Benth. En: *Manual de leguminosas de Nicaragua*. PASOLAC, EAGE. Nicaragua. Vol. II, p. 248.
- Boddington, C. L. & Dodd, J. C. 2000. The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. I. Field studies in an Indonesian ultisol. *Plant and Soil*. 218: 137.
- Bolaños, L., Martín, M., El-Hamdaoui, A., Rivilla, R y Bonilla, I. 2006. Nitrogenase inhibition in nodules from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca. *Plant Soil*. vol. 280, p. 135 - 142.

- Bomfim, E. R. P., Pinto, J. C., Salvador, N., de Moraes, A. R., de Andrade, I. F., Almeida, O. C. 2003. Efeito do tratamento físico associado à adubação em pastagens degradadas de braquiária, nos teores de proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. *Ciência e Agrotecnologia*, v.27, p. 912 - 920.
- Bonfante, P. & Anca, I. 2009. Plants, mycorrhizal fungi and bacteria: a network of interactions. *Annual Rev. Microbiol.* 63: 363.
- Brundrett, M. C. 2002. Co-evolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.*, 154: 275 - 304.
- Cabalceta, G. 1999. Fertilización y nutrición de forrajes de altura. XI Congreso Nacional Agronómico / III Congreso Nacional de Suelos. Costa Rica. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/congreso\\_agronomico\\_xi/a50-6907-III\\_239.pdf](http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_xi/a50-6907-III_239.pdf) [Consultado: 7 de septiembre de 2015].
- Cadish, G., Schunke, R.M., Giller, K.E. 1994. Nitrogen cycling in a pure grass pasture and a grass-legume mixture on a Red Latosol in Brazil. *Tropical Grasslands*, v. 28, p.43 - 52.
- Campbell, R.S., Gonzáles, M.H. 1972. Efectos de la fertilización nitrogenada en pastizales rendimiento del Pastizal. *Feb.1972*: 115 - 119.
- Canchila E. R., Soca M, Ojeda F. y Machado R. 2009. Evaluación de la composición bromatológica de 24 accesiones de *Brachiaria* spp. *Pastos y Forrajes*, Vol. 32, No. 4.
- Canchila, E.R. *et al.* 2010. Dinámica de crecimiento de 24 accesiones de *Brachiaria* spp. *Pastos y Forrajes*. 33:385.
- Cantarutti, R. B., Tarré, R. M., Macedo, R. The effect of grazing intensity and the presence of a forage legume on nitrogen dynamics in *Brachiaria* pastures in the Atlantic forest region of the South of Bahia, Brazil. *Nutrient Cycling in Agroecosystem*, v. 64, p. 257 - 271, 2002.

- Cardoso, I., Kuyper, T. 2006. "Mycorrhizas and tropical soil fertility." *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 116: 72 - 84.
- Carneiro, R. F. V., Martins, M. A., Vásquez, H. M. & Detmann, E. 2010. Doses de fósforo e inoculação micorrízica no cultivo de estilosantes em solo sob condições naturais. *Arch. Zoot.* 59: 415.
- Carneiro, R. F. V., Martins, M. A., Araújo, A. S. F., Nunes, L. A. P. L. 2011. Inoculação micorrízica arbuscular e adubação fosfatada no cultivo de forrageiras consorciadas. *Archivos de Zootecnia*. 60 (232): 1191 - 1202.
- Carvalho, G. G. P y Pires, A. J. V. 2008. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. *Arch. Zootec.* 57 (R): 103 - 113.
- Castillo, E., Ruíz, T.E., Febles, G., Puentes, R., Díaz, L.E. & Bernal, G. 1991. Utilización de las leguminosas rastreras para el crecimiento y ceba de bovinos en sistemas de bancos de proteína con libre acceso. *Comportamiento animal. Rev. Cubana Cienc. Agric.* 25: 265.
- Castillo, E., Ruiz, T.E., Hernández, J.L. & Díaz, H. 2002. Uso de las leguminosas para el mejoramiento de los pastizales y la producción de carne bovina. Informe Final del Proyecto Nacional CITMA.
- Castillo, C. G., Rubio, R., Urzúa, H. & Borie, F. 2008. Interacción *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii y hongos micorrícicos en un Andisol con diferentes niveles de saturación de aluminio. *IDESIA (Chile)* 26: 3
- Catasús, L. Manual de Agrostología. Editorial Academia. La Habana, Cuba. 98 p. 1997.
- Centro Internacional Agricultura Tropical. CIAT 1988; Informe Anual 1987. Documento de Trabajo Nº 45, 15 - 1.
- Centro Internacional Agricultura Tropical. CIAT. 1993. Trends in CIAT commodities. Working Doc. No. 128. CIAT, Cali, Colombia.

- Chacón, E. & Stobbs, T. M. 1976. Influence of progressive defoliation of a grass sward on the cating behaviour of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* 27: 709.
- Chalk, P. M., de Souza, F. R., Urquiaga, S., Alves, B. J. R., Boddey, R. M. 2006. The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance. *Soil Biol. Biochem.*, 38: 2944 - 2951.
- Chaparro, C. J. 1991. Productivity, persistence, nutritive value, and photosynthesis responses of mott elephant grass to defoliation management. University of Florida, Gainesville, FL. 322 p.
- Ciotti, E. M., Castelán, M. E., Persoglia, A., Tomei, C. E. 2003. Valor nutritivo de *Stylosanthes* spp en dos etapas fenológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: A - 026.
- Clavo, S. 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Universidad de Salamanca. CT 3 (2011) 173 - 186.
- Cook, B. G y Schultze - Kraft, R. 2015. Botanical name changes – nuisance or a quest for precision? *Tropical grasslands*. Vol. 3, no. 1. P. 34 - 40.
- Cornejo, P. E. 2006. Influencia de la cobertura vegetal sobre la diversidad y estructura de las comunidades de hongos micorrícicos y sus efectos en la estabilización de suelos degradados. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultas de Ciencias. 2006. ISBN 978-84-338-4026-4. Estación Experimental del Zaidín. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada.
- Costa, N. de L., Goncalves, C. A. y Oliveira, J. R. Da C. 1991. Avaliacao agronómica de gramíneas e leguminosas forrageiras asociadas em Rondonia, Brasil. *Pasturas Tropicales*. 13 (3): 35 - 38\_pasaporte\_2013 pasaporte\_2013
- Costa, N. M de S y Schultze-Kraft, R. 1993. Biogeografía de *Stylosanthes capita* Vog. y *Stylosanthes guianensis* Sw. var. *Pauciflora*. *Pasturas Tropicales*. Vol. 15, No. 1.



- Costa, N. M. S. Revisão do género *Stylosanthes* Sw. 2006. 469 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agronómica) – Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2006.
- Costa, K. A. P., de Oliveira, I., P., Araújo, J. L., Figueiredo, F. C., Faquin, W., Gomes, K. W. 2008. Extração de macronutrientes pela fitomassa do capim-xaraés “xaraés” em função de doses de nitrogênio e potássio. *Ciência Rural*, Santa Maria, 38 (4): 1162 - 1166.
- Covacevich, F., Marino, M. A., Echeverría, H. E. 2006. The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass. *European J. Soil Biol.*, 42: 127 - 138.
- Crespo, G., Aspiolea, J. L., López, Martha 1986. Nutrición de pastos En: Los pastos en Cuba. Tomo I. Producción EDICA. pp. 345 - 416.
- Crespo, G. y Curbelo, F. 1990. Response of *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 to phosphoric fertilization in a luvisol of Pinar del Río province. *Cuban. J. Agric. Science*. 24: 131 - 138.
- Crespo, G., Ruiz, T. E. and Febles, G. 1995. Agronomy of tropical perennial legumes. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 29:2, 119 - 131.
- Crespo, G. 2001. La problemática de la degradación de los suelos en áreas ganaderas de América Tropical. Vías sostenibles de recuperación. I Forum Latinoamericano de Pastos y Forrajes. La Habana, Cuba [cd-room].
- Crespo, G. 2009. Recuperación de la fertilidad del suelo en áreas ganaderas degradadas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 43, Número 4.
- Crespo, G. 2013. El reciclaje de nutrientes y su impacto en sistemas ganaderos en el occidente de Cuba. Tesis Dr. C. Instituto de Ciencia Animal - Universidad Agraria de La Habana, Cuba. 213 pp.

- Crespo, G., Rodríguez, I., Lok, S y González, J. J. 2015. Libro: Contribución al conocimiento de la fertilidad del suelo en los pastizales permanentes. Publicación electrónica, ISBN 978-959-7171-65-2.
- Crespo Flores, G., González, P. J., Arzola, J. y Morgan, O. 2010. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares nativos y una especie seleccionada en los pastos *Brachiaria decumbens* vc. basilisk y *Panicum maximum* vc. mombaza. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 44, Número 3.
- Crespo-Flores, G., González, P. J., Pérez, G. y Ramírez, J. F. 2012. Efecto de la co-inoculación de cepas de rizobios y una cepa eficiente de hongo micorrizico arbuscular en *Terannus labialis*. XVIII Congreso Científico Internacional del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. San José de las Lajas. Mayabeque. Del 6 - 9 de noviembre de 2012. ISBN 978-959-7023-61-6.
- Crespo-Flores, G., Ramírez, J. F., González, P. J., Hernández, I. 2014. Coinoculación de cepas de rizobios y del hongo micorrizico arbuscular en *Stylosanthes guianensis* vc. CIAT-184. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 48, Número 3.
- Cruz, C., Egsgaard, H., Trujillo, C., Ambus, P., Requena, N., Martins-Loucao, M. A., Jakobsen, I. 2007, Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Physiol. 144: 782 – 792.
- Cuesta, P. A., Barahona, R. R., Báez, F. D., Ojeda, H., Mila, A.P. y León, M.I. 2003. Renovación y manejo de praderas y utilización de ensilajes en el trópico alto. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.
- Date, R.A. 1977. Inoculation of tropical pasture legumes. In: Exploiting the legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture. Univ. Hawaii. Coll. Trop. Agric. Spec. Pub. 145. P. 293 - 311.
- de la Noval, B. M. 2008. Efecto de la interacción hongos micorrízicos arbusculares-sistemina –tomate (*Solanum lycopersicum* L. variedad Amalia) sobre proteínas de

defensa y respuesta a patógenos. Universidad Agraria de la Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez” Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Tesis de Doctorado.

-de Lorenzo, C., Iannetta, P. P. M., Feándeal, M. M., James, Lucas, M. M., Sprent, I., Witty, J. F., Minckles. 1994. II Mechanofdiffusionbarrieroperati: 146 - 1.

-de Miranda, E. M., Saggiun Júnior, O. J. y Riveira da Silva, E. M. 2008. Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para o amendoim forrageiro consorciado com braquiária. *Pesq. Agropec. Bras.* 43:1185.

- dos Santos, P. M., dos Santos, A.C., de Negreiros, J. V., Araújo, A., da Silva, J. E. 2011. Caracterização de pastagens de capim tanzânia e mombaça consorciados com estilosantes em ecótono de transição Cerrado: Floresta Amazônica. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, vol. 6, núm. 1, enero-marzo, 2011, pp. 163 - 173

-Driver, J. D., W. E. Holben, and M. C. Rillig. 2005. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 37:101 - 106.

-Duncan, D. B. 1955. Multiple ranges and multiple F test. *Biometrics.* 11: 1.

-Enríquez, Q. F. J., Meléndez, N. F. y Bolaños, A. E. D. 1999. Tecnología para la Producción y Manejo de Forrajes Tropicales en México. INIFAP. Libro Técnico No. 7. 261 p.

-Eusse, J. 1994. Pastos y forrajes tropicales – Producción y manejo. Colombia. Tercera Edición. Banco Ganadero. p. 123, 126, 127, 138, 139.

-Ezawa, T., Cavagnaro, T. R., Smith, S. E., Smith, F.A., Ohtomo, R. 2004. Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytol.* 161: 387 - 392.

-FAO. 1985. Les inoculums de légumineuses et leurs applications. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Roma. 63 pp.

- Fassio, P. O., Duarte, N. F., Melo, P. F., Oliveira, J. R. 2008. Recuperação de pastagem degradada de *Brachiaria brizantha* cv Marandu sob diferentes adubações associadas à inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares. I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí. Bambuí/MG – 2008
- Fenster, W. y L. León. 1979. Manejo de la fertilización con fósforo para el establecimiento y mantenimiento de pastos mejorados en suelos ácidos e infértiles de América tropical. In Tergas, L. y P. Sánchez (Eds). Producción de Pastos en Suelos Ácidos de los Trópicos. CIAT. Colombia. pp 119 - 133.
- Fenster, W. E. y Leon, L. A. 1986. “Considerações sobre la fertilização fosfatada no estabelecimento e persistencia de pastagens em solos ácidos de baixa fertilidade na America Latina tropical” In “Calagem e adubação de pastagem”. Associação Brasileira para pesquisa da potassa e do fosfato. Brasil. p 34.
- Fernández, F., Gómez, R., Vanegas, L. F., Martínez, M. A., de la Noval, B. M., Rivera, R. 2001. Producto inoculante micorrizógeno. Oficina Nacional de Propiedad Industrial. Cuba, Patente No. 22641.
- Fernández, E. V. J. 2012. Respuesta de la simbiosis tripartita *Rhizobium-leguminosa* – HMA ante Vanadio y Niquel. Tesis de Maestría. Institución de enseñanza e investigación en ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 168 p.
- Ferreira, M. B. e Costa, N. M. de S. 1979. O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Belo Horizonte, Brasil. 56 p.
- Filho, J. S., Cardoso, A. N., Carmona, R., de Carvalho, A. M. 2004. Fitomassa e cobertura do solo de culturas de sucessão ao milho na Região do Cerrado. Pesq. Agropec. Bras. 39 (4): 327 – 334.
- Freixas, J., Reynaldo, I. M., Nápoles, M. 2010. Influencia de la sequía sobre el metabolismo del nitrógeno fijado durante la simbiosis *Bradyrhizobium-Soya*. Cultivos Tropicales. 31(2). 66 - 73.

- Galvez, L., Douds, D. D., Drinkwater, L. E. & Wagoner, P. 2001. Effect of tillage and farming system upon VAM fungus populations and mycorrhizas and nutrient uptake on maize. *Plant and Soil*. 228: 229.
- Gamalero, E., Martinotti, M. G., Trotta, A., Lemanceau, P., Berta, G. 2004. Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions. *New Phytol.*, 155: 293 - 300.
- García, M., Treto, E., Álvarez, M. 2000. Los abonos verdes: una alternativa para la economía de nitrógeno en el cultivo de la papa. II. Efecto de la interacción abono verde - dosis de nitrógeno. *Cultivos tropicales*. 21 (1): 13 – 19.
- Gehring, C. A. and Whitham T. G. 1994. Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 251 – 255.
- Gehring, C .A. and Whitham T. G. 2002. Mycorrhizae-herbivore interactions: population and community consequences. En: *Mycorrhizal ecology*. Van der Heijden M.G. and, Sanders I (Eds.)
- Giraldo, L. M., Lizcano, L. J., Gijnsman, A. J., Rivera, B. & Franco, L.H. Adaptación del modelo DSSAT para simular la producción de *Brachiaria decumbens*. *Pasturas Tropicales*. 20 (2): 2. 1998.
- Gómez, P. E., Argenteal, L., Ávila, C; Alarcón, R., Ruiz-Díez, V., Fernández - Pascual, M y Eichler - Loebermann, B. 2013. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en frijol Caupí a partir de variables relacionadas con la nodulación y la acumulación de nitrógeno foliar. *Cultivos Tropicales*. vol. 34 no. 3. *Versión* ISSN 0258-5936.
- González, M. S., Van Heurck, L. M., Romero, F., Pezo, D. A. y Argel, P. J. 1996. Producción de leche en pasturas de Estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) solo y asociado con *Arachis pintoi* o *Desmodium ovalifolium*. *Pasturas Tropicales*. 18 (1): 2 - 12.

-González, E. A., Alfonzo, V. J., Ávila, M. C. 2004. Es posible producir más con menos ganado y. mantenga en su rancho la carga animal adecuada. [en línea] Disponible en: <http://patrocipes.eson.mx/revistارانcho/revistارانcho2004/Carga.htm>.

[Consultado: octubre 2015].

-González, P. J., Fernández, D., Plana, R. y Crespo, G. 2007. Efectos del antecedente cultural en las micorrizas nativas y la productividad del pasto brachiaria (*Brachiaria decumbens* cv. Señal). Pastos y Forrajes, Vol. 30, No. 1.

-González, R. L., Núñez, D. N., Barceló, R. 2012. Efecto de la aplicación de *Rhizobium* y Mycorriza en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9 negro. 2012. Centro Agrícola, 39(4): 17 - 20; ISSN papel: 0253-5785 ISSN on line: 2072-2001.

-González, P. J., Pérez, G., Medina, N., Crespo, G., Ramírez, J. F. & Arzola, J. 2012. Co-inoculation of ryzobium strains and one of arbuscular mycorrhizial fungi (*Glomus cubense*) and its effect on kudzú (*Pueraria phaseoloides*) Technical note. Cuban J. Agric. Sci. 46: 331.

-González, P. J. 2014. Manejo efectivo de la simbiosis micorrízica arbuscular vía inoculación y la fertilización mineral en pastos del género *Brachiaria*. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de ciencias agrícolas Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas. San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba.

-González, P. J., Ramírez, J. F., Morgan, O., Rivera, R. & Plana, R. 2015. Contribución de la inoculación micorrízica abusculara la reducción de la fertilización fosfórica en *Brachiaria decumbens*. Cultivos Tropicales, 36 (1): 135 - 142.

-Govindarajulu, M., Pfeffer, P., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D. D., Allen, J. W., Bücking, H., Lammers, P. J., Shachar-Hill, Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Nature, 435: 819 – 823.

- Gryndler, M. Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. En: Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2000.
- Gryndler, M., Hřselová, H., Cajthaml, T., Havránková, M., ezá ová, V., Gryndlerová, H.; Larsen, J. 2009. Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of aymbiotic hyphal growth and root colonization. *Mycorrhiza*, 19: 255-266.
- Guiller, K. E. y Cadisch, G. (1995) Future benefits from biological nitrogen fixation: an ecological approach to agriculture. *Plant and Soil*, 174, 255 - 277.
- Guiot. G. J. y Meléndez, N. F. 2003. Comparación morfológica de brachiarias híbrido mulato y *B.brizantha*. Tabasco. En: XV Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Tabasco, México. Disponible en: <<http://www.una.edu.ni>>. [Consultado: 3 de mayo de 2012].
- Gunawardena, S. F. B. N., Danso, S. K. A., Zapata, F. 1992. Phosphorous requirement and nitrogen accumulation by three mungbean (*Vigna radiata* (L.) Welzek) cultivars. *Plant Soil*, 147: 267-274.
- Guodao, L., Phaikaew, C., Stür, W. W. 1997. Status of *Stylosanthes* development in other countries. II. *Stylosanthes* development and utilisation in China and south-east Asia. *Tropical Grasslands*, Brisbane, v. 31, n. 4, p. 460 – 466.
- Gusmao, D., de Andrade, L. R., Favoretto, V., Braga, E., Rodríguez, V., Kardec, A. 2002. Componentes da producto de forragem em pastagens dos capins Tanzania e Mombasa. *Rev. Bras. Zootec.* 31: 1333 - 1342.
- Gutiérrez, A., Paretas, J. J., Suarez, J. D., Cordoví, E., Pazos, R., y Alfonso, H. A. 1990. Género *Brachiaria*. Una nueva alternativa para la ganadería cubana. Ministerio de la Agricultura. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes. Documento de campo. Proyecto PNUD/FAO-Cuba/86/005.64p.

- Harris, W. 1978. Defoliation as a determinant of the growth, persistence and composition of pasture. p. 67 - 84. In: J.R. Wilson (ed.). Plant relations in pastures. CSIRO, Melbourne, Australia.
- Hartnett, D. C. and Wilson G. W. T. 1999. Mycorrhizal influence on plant community structure and diversity in tall grass prairie. *Ecology* 80: 1187 – 1195.
- Hartnett, D. C. and Wilson, G. W.T. 2002. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. *Plant and Soil* 244: 319 – 331.
- Helgason, T., Fitter, A. H. 2009. Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum *Glomeromycota*). *Journal of experimental Botany*: 20 (3) 1 - 16.
- Helyar, K. R. 2003. The symptoms and effects on plants of nutrient disorders in acid soils. 3<sup>rd</sup> Australian New Zealand Soils Conference University of Sydney, Australia.
- Hernández, L., Sánchez, J.A. y Lazo, J. 1998. Caracterización espacial de la biomasa subterránea en pastizales del Instituto de Ciencia Animal. *Acta Botánica cubana*. No 116. Instituto de Ecología y Sistemática.
- Hernández, L. G y Escalona, M. A. 2003. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana*. Vol. XVI, No. 1.
- Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D. y Castro, N. 2015. Clasificación de los Suelos de Cuba 2015. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas e Instituto de Suelos de Cuba. Mayabeque, Cuba, 64 p.
- Herrera, R.A., Ferrer R.L., Furrázola, E. & Orozco, M.O. 1995. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. *Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, Evolución y Procesos sociales*. (Eds. Maximina Monasterio). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Subprograma XII. Diversidad Biológica, Mérida.



- Herzog, F., Prasuhn, V., Spiess, E., Richner, T. 2008. Environmental crosscompliance mitigates nitrogen and phosphorus pollution from Swiss agriculture. *Environmental Science and Policy*, 11: 655 – 668.
- Hetrick Bad., Wilson W.T. and Todd T.C. 1990. Differential responses of C3 and C4 grasses to mycorrhizal symbiosis, phosphorus fertilization, and soil microorganisms. *Canadian Journal of Botany*, 68: 461 - 467.
- Hutasoit, R. 2012. Effect of phosphate fertilizer and biofertilizer on absorption of phosphorus, organic matter content and root nodules production of *Stylosanthes guianensis*. International Conference on Livestock Production and -Veterinary Technology. Indonesian Goat Research Station, PO Box 1 Galang, Sungei Putih, North Sumatera.
- Hutchings, N. J., Olesen, J. E., Petersen, B. M. & Bernden, J. 2007. Modelling spatial heterogeneity in grazed sward and its effects on nitrogen cycling and greenhouse gas emissions. *Agric. Ecosystem and Environ.* 121: 152
- Iannetta, P. P. M., James, E. K., Sprent, J. I., Minchin, F. R. 1995. Time course of changes involved in the operation of the oxygen diffusion barrier in white lupin nodules. *J. Exp. Bot.* 46: 565 - 575.
- Ibrahim, M. 1994. Compatibility, persistence and productivity of grass-legume mixtures in the tropics of Costa Rica. Ph. D. Thesis. Wageningen, The Netherlands, Wageningen Agricultural University. 129 p.
- Ibrahim, M. y Mannelje, L. T. 1998. Compatibility, persistence and productivity of grass- legume mixtures in the humid tropics of Costa Rica. *Tropical Grasslands* 32: 96.
- ICA. 1990. Pastos Tropicales. Curso de Postgrado. EDICA. La Habana.
- INCA. 2015. Ficha de costo EcoMic<sup>®</sup>. Departamento de Economía. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- INCA. 2015. Ficha de costo Azofert<sup>®</sup>. Departamento de Economía. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

- Janos, D. P. 2007, Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 17: 75 – 91.
- Jiménez, J. J., Peña, J. J. 2000. Fijación biológica de N<sub>2</sub> (FBN) en leguminosas de América Latina. En: La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: el aporte de las técnicas isotópicas. Ed. Peña, J. J. IMPROSA S.A de C.V. Guanajuato. México. 1 p.
- Kanno, T., Saito, M., Ando, Y., Macedo, M.C. & Miranda, C. H. B. 2006. Importance of indigenous arbuscular mycorrhiza for growth and phosphorus uptake in tropical forage grasses growing on an acid, infertile soil from the Brazilian savannas. *Trop. Grass*. 40: 94
- Kesting J. 1977. Über nevario engobnisson sur verdesserung der in vitro methoden zurshiihungder varelanrickeit vort ragstegen dar gasells choft fur krnahrungder. DDR Sektion Trätrenharung, Leipzig 1: 306.
- Khadri, M., Tejera, N.A. y Lluch, C. 2007. Sodium chloride-ABA interaction in two common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerant. *Environ. Exp. Bot.* vol. 60, p. 211 - 218.
- Klauber-Filho, O., Siqueira, J. O., Moreira, F. M. S., Soares, C. R. F., Silva, S. 2005. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. *Tópicos Ci. Solo*, 4: 85 - 144.
- Klironomos, J. N. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84: 2292 – 2301.
- Koide, R. 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytologist* 117: 365 - 386.
- Koide, R. T. and Kabir, Z. 2000. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyze organic phosphate. *New Phytologist* 148: 511 - 517.

- Koide, R. T., Mosse, B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 14: 145 - 163.
- Kula, A. A. R., Hartnett D.C. and Wilson G.W.T. 2005. Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant-herbivore interactions. *Ecology Letters* 8: 61 – 69.
- Leigh, J., Hodge, A., Fitter, A. H. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytol.* 181: 199 – 207.
- López, M., Martínez, J. y Paretas, J. J. 1983. Nodulación en leguminosos tropicales. *Pastos y Forraje*. Vol. 6, Núm. 2.
- López, R. C., Ramírez, R. y González, L. M. 1998. Efecto de la salinidad sobre la fijación de nitrógeno en *Teramnus labialis*. [Pastos y forrajes, Cuba, V21 N4 oct - dic P351 - 354]
- López, R.C., González, L.M., Ramírez, R., Cordoví, E., Gómez, I. & Castillo, P. 2000. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas prateras en suelos afectados por la salinidad. *Pastos y Forrajes*. 23: 129.
- López-Pedrosa, A., González-Guerrero, M., Valderas, A., Azcón-Aguilar, C., Ferrol, N. 2006. *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genet. Biol.*, 43: 102 - 110.
- Lopes, J., Ricardo, A, E., Cardoso, J., Sávio, D., Joel Augusto Muniz, J. A. 2011. Doses de fósforo no estabelecimento de capim-xaraés e estilosantes Mineirão em consorcio. *R. Bras. Zootec.*, v. 40, n.12, p. 2658 - 2665.
- Lovato, M. B. and Martins, P. S. 1997. Genetic variability in salt tolerance during germination of *Stylosanthes humilis* H.B.K. and association between salt tolerance and isozymes. *Bras. J. Genet.* 20: 435 - 441.

- Lugo, M.A., Gonzáles Maza M.E. and Cabello M.N. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in a mountain grassland II: seasonal variation of colonization studied, along with its relation to grazing and metabolic host type. *Mycologia* 95: 407 - 415.
- Machado, H y Chao, L. 1980. *Stylosanthes*. Pastos y Forrajes. Tomo 3. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba.3: 3, 321 - 333.
- Marschner, H. y Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159: 89 - 102.
- Martha Jr., G. B., Corsi, M., Trivelin, P. C. O., Vilela, L. R. 2009. Recuperação de 15N-ureia no sistema solo-planta de pastagem de capim-tanzânia. *R. Bras. Ci. Solo*, 33: 95 - 101.
- Martín, G. M., Reyes, R y Ramírez, J. F. 2015. Coinoculación de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. con *Rhizobium* y hongos micorrízicos arbusculares en dos tipos de suelos de Cuba. Versión ISSN 1819-4087. *Cultrop* vol.36 no.2
- Martines, C. E. y Fonseca, B. N. 1998. Manejo e fertilidade do suelo en pastagens do capim- elefante. *Belo Horizonte. Informe Agropecuario* 19 (192): 44 - 54.
- Martínez, R., López, M., Dibut, B., Parra, C., Rodríguez, J. 2007. La fijación del nitrógeno atmosférico en el medio tropical, Ed. MPPAT, Caracas, 190 p.
- Martínez- Viera, R., Dibut, A. B. 2012. Biofertilizantes bacterianos. Editorial científico técnica, La Habana, Cuba. 279 p.
- Mayea, S. S., Novo, R. S., Valiño, A. A. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Pueblo y Educación. 2<sup>da</sup> edición. 1991.
- Mesa, A.R., Hernández, M., Reyes, F. y Ávila, Vivian. 1989. Niveles críticos de K en *Teramnuslabialis*. *Pastos y Forrajes*. 12:239
- Mesa, A.R., Lajonchere, G., Prieto, M. and Toral, Odalis. 1993. Organogénesis en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184. *Pastos y Forrajes*. 16: 3, 207 - 210.

- Miller, R. M.; Reinhardt, D. R.; Jastrow, J. D. 1995. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia*, 103: 17 - 23.
- Miles, J. W. and Lascano, C. E. 1997. Status of *Stylosanthes* development in other countries. I. *Stylosanthes* development and utilization in South America. *Tropical Grasslands*, Brisbane, v. 31, n. 5, p. 454 – 459.
- Miles, J. W. 2006. Mejoramiento genético en *Brachiaria*. Objetivos estratégicos, logros y proyección. *Pasturas Tropicales*. 28 (1): 26.
- MINAG. 2005. Programa para la reconstrucción de la masa ganadera. Síntesis del informe "Análisis integral de la situación actual y perspectiva del desarrollo de la ganadería vacuna en el país". Ministerio de la Agricultura. Cuba. 16 p.
- MINAG. 2014. Precios de semillas de *Stylosanthes guianensis*. Carta tecnológica agrícola, Dirección de Precios, Ministerio de la Agricultura. Cuba.
- Miranda, J. C. C., Vilela, L. & Miranda, L. N. 2005. Dinâmica e contribuição da micorriza arbuscular em sistemas de produção com rotação de culturas. *Pesq. Agrop. Br.* 40: 1005
- Montaño, N. M., Camargo-Ricalde, S. L., García-Sánchez, R., Monroy, A. 2007. Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (*Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems*). Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa SA de CV, UAM-Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. Distrito Federal, México. 460 pp.
- Monteiro, H. C. F., Cantarutti, R. B., Nascimento J. R. 1998. Dinâmica de decomposição e mineralização de nitrogênio em função da qualidade de resíduos de gramíneas e leguminosas forrageiras. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p.1092 - 1102.
- Moreira, L. M., Martuscello, J. A., Fonseca, D. M., Mistura, C., de Moraes, R. V., Ribeiro Jr, J. I. R. 2009. Perfilhamento, acúmulo de forragem e composição

bromatológica do capim-braquiária adubado com nitrogênio. R. Bras. Zootec., 38 (9): 1675 - 1684.

-Muller, R. 1975. "Uso de especies forrajeras eficientes a niveles bajos de fósforo disponible en el suelo" In "Producción de pastos en suelos ácidos de los trópicos". Sección II. CIAT. Colombia. p 120.

-Nápoles, M. C., Gómez, G., Costales, D. 2008. Factores de Nodulación. Experiencia en Cuba. Cultivos Tropicales. versión ISSN 0258-5936. v. 29 n. 2

-Nautiyal, C. S., Chauhan, P. S., Das Gupta, S. M., Seem, K., Varma, A., Staddon, W. J. (2010). Tripartite interactions among *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488, *Piriformospora indica* DSM 11827, and *Cicer arietinum* L. W. J. Microbiol. Biotechnol., 26: 1393 - 1399.

-Olivera, Y., Machado, R., del Pozo, P. P. 2006. Características botánicas y agronómicas de especies forrajeras importantes del género *Brachiaria*. Pastos y Forrajes, Vol. 29, No. 1, p. 5.

-Olivera, Y., Machado, R., Ramirez, J. F., Castañeda, L. 2012. Evaluación del establecimiento de una colección de accesiones de *Brachiaria brizantha* asociadas con *Stylosanthes guianensis* CIAT-184 Pastos y Forrajes, vol. 35, núm. 2, abril-junio, 2012, pp. 153 - 164.

-Paciullo, D. S. C., Aroeira, L. J. M., Alvim, M. J. 2003. Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, n. 3, p.421 - 426.

-Palhano, A. I., de Faccio, P.C., Dittrich, J. R., de Moraes, A., Barreto, M. Z. e Ferreira, M. C. 2005. Sward structure and defoliation patterns in mombaça grass according to different canopy heights. Rev. Bras. Zoot. 34(6): 425 - 433.

-Palladino, A., Marisa Wawrzekiewicz, M. y Bargo, F. 2006. La Fibra. En: Fisiología digestiva y Manejo del Alimento. Infortambo, Bs. As., 202: 82 - 84. Disponible en <[www.producción-animal.com.ar](http://www.producción-animal.com.ar)>. [Consultado: julio de 2015].

- Paneque, V. M., Calaña, J. M. 2001. La fertilización de los cultivos. Aspectos teórico-prácticos para su recomendación. Folleto impreso. INCA. 25 p.
- Paneque, V. M., Calaña, J. M., Calderón, M., Borges, Y., Hernández, T. y Caruncho. M. 2011. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Mayabeque: Ediciones INCA. 153 pp. ISBN: 978-959-7023-51-7.
- Paretas. J. Ecosistema y regionalización de pasto en Cuba. Ministerio de la Agricultura, IIPF. Perspectivas. Ciencias nos Tropicis Brasileiros. Serie Agronomía. 1991.
- Parra, T. C. 2012. Efecto de Rhizobium y micorrizas arbusculares en el desarrollo de *Cajanus cajan* en presencia de abonos verdes, en suelos naturales de la localidad de Espino estado Guárico. Tesis presentada en Opción al grado de Master en Ciencias del Suelo. Universidad Central de Venezuela. 79 p.
- Patiño, R., Pérez, R. y Pérez, J. 2013. Efecto de la aplicación de diferentes tipos de abono sobre la producción y calidad nutricional del pasto colosuana *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus, en Sabanas de Sucre, Colombia. Livestock Research for Rural Development. 25 (8) 2013.
- Pérez, M., Morillo, M. y Malpica, L. 2009. Eficiencia de cuatro especies de *Centrosema* para utilizar fósforo de la roca fosfórica Riecito en suelos con diferentes capacidades de retención de fósforo. Rev. Zootecnia Tropical. V. 27, N. 3, p. 239 - 247.
- Pérez, G., Gómez, G., Nápoles, M. C., Morales, B. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. Pastos y Forrajes, vol. 31, núm. 2, junio, pp. 151 - 159.
- Pérez de los Reyes, R. 2011. Estado del medio ambiente. Agencia de Medio Ambiente. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Disponible en: <<http://www.medioambiente.cu/.../files/capítulo.pdf>>. [Consultado: julio de 2015].

- Phoenix, G. K., Johnson, D., Grime, J. P., Booth, R. E. 2008. Sustaining ecosystem services in ancient limestone grassland: importance of major component plants and community composition. *Journal of Ecology* 96: 894 – 902.
- Pietikäinen A., Kytöviita M.M. and Vuoti U. 2005. Mycorrhiza and seedling establishment in a subarctic meadow: effects of fertilization and defoliation. *Journal of Vegetation Science* 16: 175 – 182.
- Pinto, J. C., Siqueira, J. O., Morais, A. R., Santos, C. L. 2002. Influência do fósforo, micorriza e nitrogênio no conteúdo de minerais de *Brachiaria brizantha* e *Arachis pintoi* consorciados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 605-616.
- Purin, S. and M. C. Rillig. 2007. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia*, v. 51: 123-130.
- Quecini, V. M., de Oliveira, C. A., Alves, A. C, Vieira, M. L. C. 2002. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genetics and Molecular Biology*. 25, 1, 73 - 80.
- Rabie, G. H., Aboul-Nasr, M. B. & Al-Humiany, A. 2005. Increased salinity tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* and a nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. *Mycobiology* 33: 51
- Ramírez, J. F., González, P. J. & Salazar, X. 2006. Los hongos micorrizógenos arbusculares una opción para la producción eficiente de pastos en agroecosistemas frágiles. XV Congreso Científico del INCA. IV Simposio de Caracterización y Manejo de Microorganismos Rizosféricos. CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba.
- Ramírez, J. L., Herrera, R. S., Leonard I., Verdecia, D. y Álvarez, Y. 2012. Rendimiento y calidad de la *Brachiaria decumbens* en suelo fluvisol del Valle del Cauto, Cuba. *REDVET - Revista electrónica de Veterinaria*, Vol. 13, Núm. 4.



- Read, D. J. 1998. Mycorrhiza-the state of the art. In: Varma A, B Hock. Mycorrhiza Springer-Verlag. Berlin. 3 - 36 p.
- Read, D. J. y Pérez - Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems. *New Phytol.*, 157: 475 – 492.
- Requena, N., Breuninger, M., Franken, P., Ocon, A. 2003. Symbiotic status, phosphate and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol.*, 132: 1540 - 1549.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., Mc Neill, A. M., Prigent - Combare, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321:305 – 339.
- Rieger, F. W y Moreira, M. 2013. Dependência micorrízica do amendoineiro sob doses de fósforo. *Solos e Nutrição de Plantas*. Artigo 184. *Bragantia*, Campinas, v. 72, n. 2, p. 184 - 191.
- Riera, M., Medina, N. 2005. Influencia de las micorrizas sobre las poblaciones bacterianas y su efecto sobre los rendimientos en secuencias de cultivos. *Cultivos Tropicales*. 26(4): 21 - 27.
- Rillig, M. C. y Mummey, D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171: 41 - 53
- Rincón C. A. 1999. Degradación y Recuperación de Praderas en los Llanos Orientales de Colombia. *Boletín Técnico N° 19*. CORPOICA – PRONATTA. Villavicencio. Meta. Colombia. 48p.
- Ríos, A. 2002. Dinámica y control de *Cynodon dactylon* en sistemas mixtos de siembra directa y laboreo convencional. Disponible: <http://inia.org.uy/publicaciones/documentos/le/pol/2002/informe27.pdf> [Consultado:10 de mayo de 2015].
- Rivera, R., Fernández, K. 2003. Bases científico-técnicas para el manejo de los sistemas agrícolas micorrizados. En: Rivera, R. /et al./. *El manejo efectivo de*

lasimbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: ElCaribe. La Habana: 49 - 94.

-Rodríguez, C., Sevillano, F., Subramaniam, P. 1985. La fijación del nitrógeno atmosférico. Una biotecnología en la producción agraria. CSIC - Centro de Edafología y Biología Aplicada de Salamanca (CEBA). Temas monográficos. Número 16. Versión del editor: <http://www.irnasa.csic.es/>. URL: <http://hdl.handle.net/10261/24139>. ISBN: 84-00-06194-2. Aparece en las colecciones: (IRNASA) Material de divulgación).

-Rodríguez, I., Crespo, G., Torres, V. & Fraga, S. 2005. Effect of the dung patches and the urine on the chemical composition of the pasture and their effect on the soil under grazing conditions or not. Cuban J. Agric. Sci. 39: 289.

-Rodríguez, I., Hernández, L., Crespo, G., Sandrina, B. & Fraga, S. 2013. Performance of below ground root biomass in different grassland of Mayabeque province, Cuba. Cuban J. of Agricultural Science. 2: 2013.

-Rodríguez, J.J. y L.R. Aviles. 1997. Pastoreo intensivo y tradicional: su influencia sobre el sistema suelo-planta-animal en el sureste de México. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 5 (suplm. 1): 72 - 75.

-Rodríguez, Y., Arias, L., Medina, A., Mujica, Y., Medina, L. R., Fernández, K. y Mena, A. 2015. Alternativa de la técnica de tinción para determinar la colonización micorrízica. Cultivos Tropicales, vol. 36, no. 2, pp. 18 - 21.

-Rojas, S., Olivares, J., Jiménez, R. & Hernández, E. 2005. Manejo de praderas asociadas de gramíneas y leguminosas para pastoreo en el trópico. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET - ISSN 1695-7504. Vol. VI, N° 5.

-Romero, F. y González, J. 1999. Produciendo mas leche mediante pasturas asociadas con *Arachis pintoii*. Tropileche. Hoja informativa No. 6.

-Rosales, M. 2006. Mezclas de forrajes: Uso de la diversidad forrajera tropical en sistemas agroforestales. Conferencia electrónica de la FAO sobre "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica". 1 p

- Rua, M. 2008. Pastos de corte para el trópico. Artículo técnico-ganadería de carne, Cultura empresarial ganadera, Colombia. Disponible en <http://www.Engormix.com>.
- Ruiz, T. E., Febles, G. & Días, H. 2001. Evaluation of tres for increasing plant diversity in silvopastoral Systems. International Symposium on Silvopastoral System. 2<sup>nd</sup> Congress on Agroforestry and Livestock Production in Latin America. CATIE, Costa Rica. P. 100
- Ruíz, T. E., Alonso, J., Febles, G. & Lok, S. 2005. Las leguminosas para la producción de biomasa en el trópico. III Foro Latinoamericano de Pastos y Forrajes. La Habana, Cuba. CD-ROM
- Saif, S. R. 1987. Growth responses of tropical plant species to vesicular arbuscular mycorrhizae. I. Growth, mineral uptake and mycorrhizal dependency. *Plant and Soil* 97: 25
- Saito K., Suyama Y., Sato S., and Sugawara K. 2004. Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza* 14: 363 - 373.
- Sánchez, A. 1998. Leguminosas como potencial forrajero en la alimentación bovina. FONAIAP. Estación Experimental del Estado de Falcón. Venezuela. Disponible: <http://www.Ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd50/leguminosas.htm>. [Consultado: Diciembre de 2014].
- Santos Jr, J. D. G., Monteiro, F. A., Macedo, M. C. M. 2006. Sensibilidade de índices dris em folhas diagnósticas de capim-tanzânia ao tempo de rebrotação da pastagem. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 27. Resumos. Viçosa: SBCS/Embrapa Agropecuária Oeste.
- Sarabia, M., Madrigal, R, Martínez, M & Carreón, Y. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12 : 65
- Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J. N., Endre, G., Gero, S. D. y Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated

lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, vol. 89 p. 192 - 196.

-Shüßler, A. & Walker, C. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Gloucester: The Royal Botanic Garden Edinburgh. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. 58 pp.

-Siddiqui, Z. A., Sayeed, M., Futai, K. Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry. 2008. Ed: Springer Science + Business Media B. V., 359 p. ISBN: 978-1-4020-8769-1.

-Silva, J.J. da, Saliba, E. de O.S. 2007. Pastagens consorciadas: uma alternativa para sistemas extensivos e orgânicos. Veterinária e Zootecnia, v.14, p.8 - 18.

-SIB. 2015. Portal de datos SIB. Sistema de información sobre Biodiversidad de Colombia. Disponible en: <http://data.sibcolombia.net/species/browse/taxon/147526/> [Consultado: 5 de noviembre de 2015].

-Skerman, P. J., Cameron, D., Riveros, F. 1991. Leguminosas forrajeras tropicales. Producción y protección vegetal N° 2. FAO: 425 - 477.

-Smith, S. E. 2002. Soil microbes and plants—raising interest, mutual gains. New Phytol. 156: 142 – 144.

-Smith, S. E., Read, D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. San Diego, CA, USA: Academic Press.

-Souza, R. F., J. C. Pinto, J. O. Siqueira, N. Curi e A.R.Morais. 2000. Influência de micorriza e fósforo sobre o rendimento de matéria seca e qualidade de *A. gayanus* e *S. guianensis* cultivados em um Latossolo. Pastos Tropicales, 22: 34 - 41.

-Spaink, H. P., Sheeley, D. M., van Brussel, A., Glushka, J., York, W. S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E. P., Reinhold, V. N. y Lugtenberg B. J. J. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of Rhizobium. Nature, vol. 354, p. 125 - 130

- Stace, H. M. and Edye, L. A. (eds.) 1984. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, North Ryde, N. S. W. Australia. 636 p.
- Suarez W. V., Lovato E., de Sousa D. M. G. e Vilela L. 2001. Adubação fosfatada para manutenção de Pastagem de *Brachiaria deucmbens* no cerrado. Com. Tec. Embrapa, Cerrados, Plantina, n. 53, p 1 - 5, ISSN 1517-1469. Brasília D. F.
- Taiz, L y Zeiger, E. 2006. *Filosofía vegetal*, Vol. I, Castellón de la Plana, p. 121.
- Tajini, F. y Drevon, J. J. 2012. Effect of arbuscular mycorrhizas on P use efficiency for growth and N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Sci. Res. Essays. 7: 1681.
- Tajini, F., Trabelsi M., Drevon, J. J. 2012. Arbuscular mycorrhizas by contact with mycorrhized *Stylosanthes guianensis* enhance P use efficiency for N<sub>2</sub> fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). African Journal of Microbiology Research Vol. 6 (6), pp. 1297 - 1305.
- Tamayo, Y. 2014. Coinoculación de Rhizobium sp. y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en *Canavalia ensiformis* (L) D. C cultivada sobre un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado. Tesis de Maestría. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
- t'Mannetje, L. T. 1977. "A revision of varieties of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Aust. J. Bot. 25 (3) p 347 - 362.
- t'Mannetje, L. T. 1984. Consideration on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. In: Stace, H. M.; Edye, L. A. (Eds.). The biology and agronomy of *Stylosanthes*. North Ryde: Academic Press Australia. p. 1 - 21.
- t' Mannetje, L. T y Haydock, K. P. 1963. The dry weight rank method for the botanical analysis of pasture. J. Brit. Grassld. Soc. 18: 268.
- t'Mannetje, L.T and Jones, R. M. 1992. "Plant resources of South East Asia" N<sup>o</sup>4 Forages: 211 - 213. Pudoc. Scient. Publis. Wageningen (Holanda).

- Tessema, Z., Baars, R. M. T. 2006. Chemical composition, dry matter production and yield dynamics of tropical grasses mixed with perennial forage legumes. *Tropical Grasslands*. 40: 150 – 156.
- Toledo, J. 1982. "Manual para la evaluación agronómica. Red internacional de Evaluación de Pastos Tropicales RIEPT" Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT Colombia: 91 - 110.
- Tomei, C. E., Ciotti, E.M., Castelan, M. E. 1997. Alfalfa tropical: *Stylosanthes guianensis*. Boletín Técnico N° 7. Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, 7 pp.
- Tomei, C. E., Castelan, M. E., Ciotti, E. M., Benitez, J. A. y Huguet, H. H. 1999. Deficiencias nutritivas en *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 en suelos de Corrientes, Argentina. *Agrotecnia* 5: 16 – 20.
- Tomei, C. E., Ciotti E. M., Castelan, M. E., Hack, C. M. 2003. Determinación de deficiencias y su corrección para *Stylosanthes guianensis* en un Argiudol. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: A-024.
- Toro, M., Bazó, I. & López, M. 2008. Micorrizas arbusculares y bacterias promotoras de crecimiento vegetal, Biofertilizantes nativos de sistemas agrícolas bajo manejo conservacionista. *Agronomía Trop.* 58: 215.
- Trouvelot, A., Kough, J., Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization 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.
- Urbano, D., Castro, F. & Dávila, C. 2005. Efecto de la presión de pastoreo y fertilización NPK sobre la composición botánica de la asociación kikuyo-maní forrajero en la zona alta del estado Mérida. *Zootecnia Trop.* 23: 333.
- Valentim, J. F., Carneiro, J. da C.; Sales, M. F. L. 2001. Amendoim forrageiro cv. Belmonte: leguminosa para a diversificação das pastagens e conservação do solo no Acre. Rio Branco: Embrapa Acre. 18p. (Embrapa Acre. Circular Técnica, 43).

- Van Der Heijden, M. G. A. 2010. Mycorrhizal fungi reduce nutrient loss from model grassland ecosystems. *Ecology*, 91(4): 1163–1171.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and no starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74: 3583 - 3597.
- Vargas, Y. & Valdivia, L. A. 2005. Recuperación, mediante leguminosas rastreras, de suelos degradados (ex cicales) en la Selva Alta del Perú. *Mosaico Cient.* 2: 78
- Vega, M., Ramírez, J., Leonard, I. e IGARZA, A. 2006. Rendimiento, caracterización química y digestibilidad del pasto *Brachiaria decumbens* en las actuales condiciones climáticas del Valle del Cauto. *Revista Electrónica De Veterinaria REDVET*. Vol. VII No. 5. Disponible en [http://www. Veterinaria.org/revistas/redvet](http://www.Veterinaria.org/revistas/redvet).
- Veloz, M. C. 2004. Evaluación de dos métodos de henificación de pastos. Tesis de Doctorado en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Quito. Ecuador.
- Vera, W., Ramírez, P., Farfán, C. y Paladines, O. 1994. Introducción y evaluación de germoplasma forrajero en tres ecosistemas del trópico húmedo y semihúmedo del litoral ecuatoriano. Serie técnica. *Pastos y Forrajes* No. 9. P. 21 - 44.
- Villaquirán, M. y Lascano, C. 1986. Caracterización nutritiva de cuatro leguminosas forrajeras Tropicales. *Pasturas Tropicales*. Boletín. 8(2): 2 - 6.
- Villegas, J., Fortin, J. A. 2002. "Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NO<sub>3</sub>- as nitrogen source" *Can. J Bot.* 80: 571 - 576.
- Wang, S. G., Lin X. G., Yin R. and Hou Y. L. 2004. Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on the degradation of dehp in soil. *Journal of Environmental. Science* 16: 458 - 461.
- Wearn, J. A. and Gange A. C. 2007 Above-ground herbivory causes rapid and sustained changes in mycorrhizal colonization of grasses. *Oecologia* 153: 959 – 971.

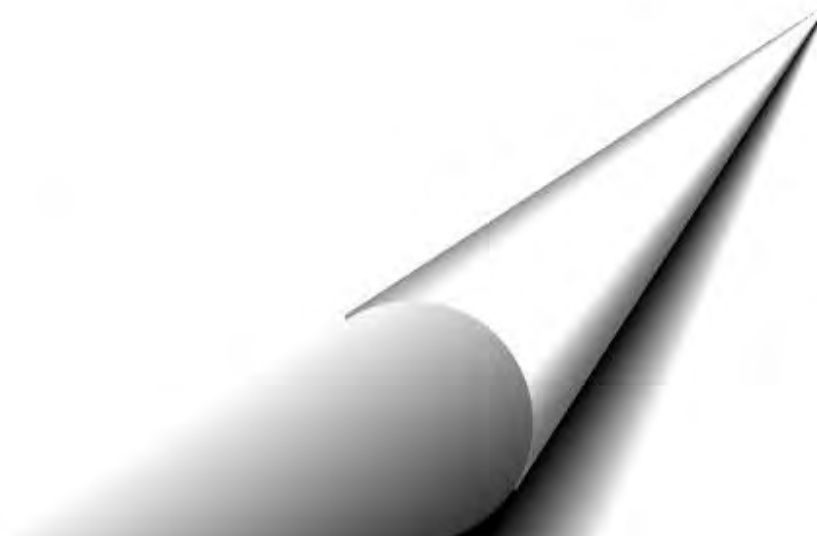
-Williams, R. J., Reid, R.; Schultze-Kraft, R. Costa, N. M. S. Thomas, B. D. 1984. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: Stace, H. M., Edye, L. A. (Ed.). *The biology and agronomy of Stylosanthes*. North Ryde: Academic Press Australia. p. 73 - 101.

-Yao, Q., Zhu, H. H., Hu, Y. L., Li. L. Q. 2008. Differential influence of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on growth of dominant and subordinate plants. *Plant Ecol.* 196: 261 - 268.

-Zhang, T., Sun, Y., Shi, Z., Feng, G. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi can accelerate the restoration of degraded spring grassland in Central Asia. *Rangeland Ecology & Management*, 65 (4): 426 – 432.



# ANEXOS



## Anexo 1. Descripción y foto del perfil del suelo

**No. Perfil:** 1

**Fecha:** mayo de 2014

**Autores:** A. Hernández, P.J. González, G. Crespo, J. Ramírez y R. Rivera

**Localidad:** Cascajal, Manacas (aproximadamente a 3 km al norte de la Carretera Central)

**Coordenadas:** 31° grado a 21' de latitud este y 20° grados y 21' de longitud oeste.

**Municipio:** Santo Domingo

**Provincia:** Villa Clara

**Relieve:** Llano (llanura pliocénica eosivo-denudativa)

**Altura:** 70-80 msnm

**Pendiente donde se tomó el perfil:** <2%

**Material de origen:** Sedimentos diferenciados texturalmente

**Vegetación:** Pasto *Brachiaria decumbens*, cv. Basilisk

**Drenaje:** Interno: Deficiente; Externo: Bueno

**Clima:** Tropical subhúmedo

**Precipitaciones anuales:** 1400 mm

**Temperatura Media anual:** 24,5°C

**Diagnósticos**

**Procesos de formación:** Gleyzación, Formación de horizonte petroférico

**Horizontes de diagnóstico**

**Normales:** Álbico, petroférico

**Características de diagnóstico:** Propiedaes gléyicas a 46 cm de profundidad.

**Perfil diagnóstico:**

**Clasificación de suelos de Cuba (1999):** Gley Nodular Feruginoso, arénico, álbico, petroférico, dístrico

**Clasificación World Reference Base (2008):** Gleysol

**Clasificación Soil Taxonomy (2010):** Typic Plinthaquult o Typic Plinthaqualf

### Descripción del perfil

Horizonte	Prof. en cm.	Descripción
A <sub>11</sub> nf	0 – 9	Color 10YR4/4, pardo amarillento oscuro, franco arenoso, estructura débil del tipo nuciforme terronosa, friable, seco, los agregados poco porosos, con muchos cristales muy pequeños, brillantes, posiblemente de cuarzo, con 10-20% de gravas silíceas recubiertas por una capa ferruginosa de color 10YR5/4 pardo y por dentro 2,5YR8/2 blanco rosado recubierta por otra 2,5YR8/4 rosada, con raíces, sin reacción al HCl, transición algo notable
A <sub>12</sub> nf	9 – 21	Color 10YR5/3, pardo, franco arenoso, poco estructurado con agregados del tipo nuciforme terronosa, friable, seco, los agregados son poco porosos, 20-30% de gravas igual al horizonte anterior, con menos cristales pequeños, con menos raíces, sin reacción al HCl, transición notable

E <sub>11</sub> albnf	21 – 28	Color 10YR8/1, gris claro, franco arenoso, sin estructura, con 30% de nódulos y gravas ferruginosas, de color friable, seco, casi sin raíces, sin reacción al HCl, transición gradual
E <sub>12</sub> albnfptf	28 – 46	Color 7,5YR7/4, rosado, franco arenoso, con 40% de nódulos y gravas ferruginosas de color 7,5YR7/3, rosado, con bloques petroféricos, sin estructura, friable, seco, sin raíces, sin reacción al HCl, transición notable
Bg	46 – 90	Horizonte petroférico con fragmentos ferruginosos de color 5YR5/8, rojo amarillento, 5YR4/4, pardo rojizo y 5YR2,5/1, negro, sin estructura, compacto, sin raíces, sin reacción al HCl.



**Anexo 2. Cálculo de la depreciación del pastizal de *Brachiaria decumbens* en un año**

Labores	Salarios	Combustibles		Maquinaria		Otros Gastos	
	CUP	CUP	CUC	CUP	CUC	CUP	CUC
<b>I- Siembra</b>							
Aradura	12.62	27.74	27.74	8.48	5.08	-	-
Aradura media	2.82	11.35	11.35	2.15	1.29	-	-
Cruce	7.71	18.58	18.58	5.72	3.43	-	-
Grada fina	1.83	4.42	4.42	2.14	1.28	-	-
Surcado	5.92	13.66	13.66	4.45	2.67	-	-
Sub total	30.90	75.75	75.75	22.94	13.75	-	-
<b>II- Labores de Siembra</b>							
Siembra mecánica	2.24	6.34	6.34	2.16	1.30	-	-
Aradura fina	1.83	4.42	4.42	2.14	1.28	-	-
Semilla (8 kg ha <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-	298.68	-
Fertilización (50 g ha <sup>-1</sup> )	7.20	5.28	3.49	2.09	-	108.32	-
Sub total	11.27	16.04	16.04	6.39	2.58	407.00	-
<b>III- Labores de cultivo</b>							
Limpieza manual	61.72	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	103.89	91.79	91.79	29.33	16.33	407.00	-

**Nota:** Con la suma de los gastos totales en salarios, combustibles, maquinarias y otros gastos (632.01 CUP) entre la vida productiva del pastizal estimada (5 años) se obtuvo el valor de la depreciación del pastizal, que es igual a 126.40 CUP por año.