



Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas
Universidad de Guantánamo
Facultad Agroforestal de Montaña

Coinoculación de *Rhizobium* sp. y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en *Canavalia ensiformis* (L) D.C. cultivada sobre un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado

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

Autor: Ing. Yonger Tamayo Aguilar

Tutora: Dra. C. Gloria M. Martín Alonso

San José de las Lajas, Mayabeque

2014

AGRADECIMIENTOS

- A la Revolución Cubana, por darme la posibilidad de estudiar.
- A la Universidad de Guantánamo en especial a la Facultad Agroforestal de Montaña por el apoyo brindado en la culminación de esta tesis y la formación de un mejor profesional.
- A mis colegas del Departamento de Producción de Montaña quienes me apoyaron en todos los momentos del desarrollo de esta tesis.
- Al colega y amigo Carlos Anselmo Sánchez por su ayuda y dedicación en las diferentes acciones realizadas antes y después en los experimentos realizados.
- Al INCA, por acogerme y brindarme las facilidades para mi formación.
- A mi tutora, Dra. C. Gloria Martín Alonso por sus orientaciones, con su ayuda y su esfuerzo incondicional, hizo posible que se cumpliera el desarrollo exitoso de este trabajo.
- A mis padres, hermanos y familiares, motores impulsores de mi educación que sin ellos sería imposible este momento significativo de mi vida.
- A mi esposa por su apoyo y comprensión durante todos estos años.
- A los amigos y compañeros del grupo de la maestría: Yenssy Acosta, Katerine Oropesa, Leydis Perdomo y Moisés Morejón, por el trabajo conjunto en el afán de hacernos Maestros en Ciencias.
- A los colegas del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas por acogerme como uno de ellos.
- A los doctores Adriano Cabrera, José A. Herrera y María C. Nápoles por su contribución a la mejora del documento.
- Al Lic. Ionel Hernández por su dedicación y revisión del documento.
- A los técnicos Kirenia Aguilera, Hilda Bompío y Tomás Hernández por su ayuda en el análisis de las muestras de laboratorio.
- A los colegas de convivencia y responsables de las casitas de posgrado por acogerme como uno más de ellos.

A todos, muchas gracias

DEDICATORIA

- Con amor, a quienes debo no solo la existencia, sino la razón y el sentido de la vida.
- A mis familiares más queridos en especial a mi madre Marlenis Aguilar López, hermanos, esposa y amigos, que a lo largo de esta tarea me estrecharon sus manos atentamente hasta en las más difíciles circunstancias.

Y a todos aquellos que confiaron siempre en mí.

SÍNTESIS

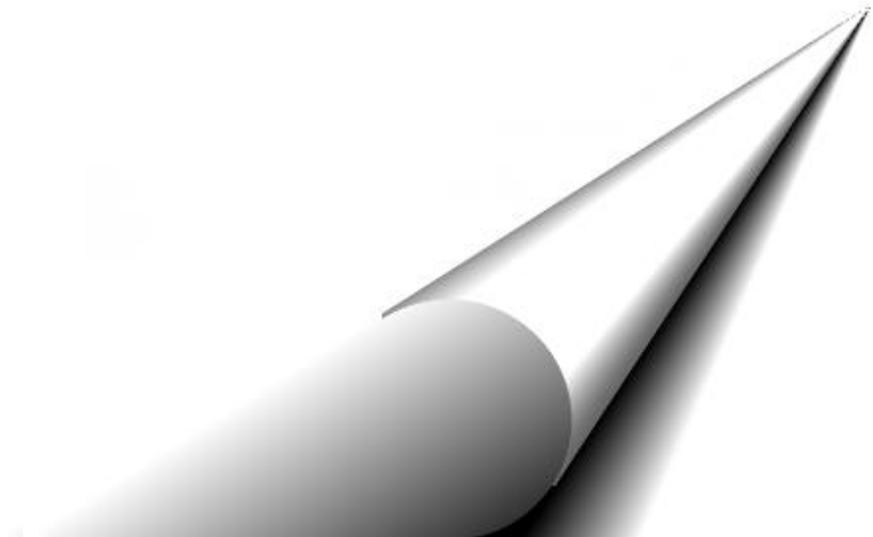
Con el objetivo de evaluar la respuesta de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. a la coinoculación de cuatro aislados de *Rhizobium* sp. provenientes de nódulos de Canavalia y dos cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado, se desarrolló la presente investigación en áreas del Polígono Docente de la Facultad Agroforestal de Montaña y la UBPC Hermanos Sánchez, ambas ubicadas en el municipio El Salvador, provincia Guantánamo, durante los meses abril - julio de 2010 y noviembre de 2010 a febrero de 2011. Los tratamientos se distribuyeron en cuatro réplicas en un diseño experimental de bloques al azar con arreglo bifactorial, donde los factores de estudio fueron cinco niveles del factor inoculación de *Rhizobium* sp. (aislados Can 2, Can 3, Can 4 y Can 5 más un tratamiento sin inoculación) y tres niveles del factor inoculación micorrízica (*Glomus cubense*, *Rhizophagus intraradices* y un testigo sin inoculación), para un total de quince tratamientos. Para la selección de los mejores aislados de *Rhizobium* y cepas de HMA, se evaluó masa seca aérea, extracción de nutrientes, variables de la nodulación (nódulos totales, masa seca y efectividad de los nódulos) y variables fúngicas (colonización micorrízica, densidad visual y número de esporas). Los resultados mostraron que Canavalia tuvo respuesta a la coinoculación *Rhizobium* - HMA en las diferentes variables evaluadas, con mayor significación en el período lluvioso, destacándose la combinación del aislado Can 5 y la cepa de HMA *Rhizophagus intraradices*, la cual incrementó los indicadores estudiados, manifestándose como las mejores cepas de estos microorganismos para la Canavalia en este tipo de suelo.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1.	Abonos verdes. Definición y funciones.....	4
2.1.1.	Algunas características que deben reunir los abonos verdes	5
2.1.2.	Características generales de la especie <i>Canavalia ensiformis</i>	6
2.2.	Efectos de los abonos verdes sobre las características físicas, químicas y biológicas del suelo	9
2.2.1.	Producción de masa seca y contenido de nutrientes	11
2.2.2.	Fijación biológica de nitrógeno por las leguminosas.....	12
2.2.3.	La simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	13
2.2.4.	Formación de nódulos en las leguminosas	14
2.3.	Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA).....	15
2.3.1.	Diferentes asociaciones micorrízicas	16
2.3.2.	Principales beneficios de los HMA en la nutrición de las plantas.....	17
2.3.3.	Factores que afectan la colonización micorrízica.....	19
2.3.4.	Simbiosis <i>Rhizobium</i> - HMA- leguminosas.....	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1.	Condiciones experimentales	23
3.1.2.	Condiciones climáticas de los períodos evaluados.....	24
3.2.	Diseño experimental.....	25
3.3.	Métodos de inoculación de los biofertilizantes empleados	26
3.4.	Evaluaciones realizadas y metodologías empleadas	27
3.5.	Análisis estadístico	29
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30

4.1.	Masa seca aérea de Canavalia en los períodos estudiados.....	30
4.2.	Extracción de nutrientes.....	34
4.3.	Nodulación de Canavalia en los períodos evaluados	38
4.4.	Variables del funcionamiento fúngico.	44
4.4.1.	Colonización micorrízica y densidad visual de Canavalia en los períodos evaluados.....	44
4.4.2.	Número de esporas de HMA en la rizosfera de Canavalia en los diferentes períodos evaluados.	49
4.5.	Consideraciones generales.....	55
V.	CONCLUSIONES.....	57
VI.	RECOMENDACIONES.....	58
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

Introducción



I. INTRODUCCIÓN

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

Por otra parte, es una realidad el bajo contenido orgánico en los suelos agrícolas, que se hace necesario compensar de alguna manera, aparejado a esto, la aplicación indiscriminada de fertilizantes nitrogenados, ocasionan en gran medida la contaminación del suelo, agua, atmósfera, los productos agrícolas y desequilibrio en los agroecosistemas, indicando que el uso de estos fertilizantes no es una solución sostenible para mejorar las condiciones nutricionales de las plantas, pues estos son caros y la mayoría de las veces son importados y su aplicación está restringida para los productores de bajos y medianos ingresos (Beltrán *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2008).

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

En las condiciones de Cuba, *Canavalia ensiformis*, es capaz de aportar más de 150 kg.ha⁻¹ de N y hasta 5 t.ha⁻¹ de masa seca, además de elevar sosteniblemente los rendimientos de cultivos tan diversos como maíz, papa, calabaza, malanga, entre otros (García *et al.*, 2002).

Al mismo tiempo, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos que permiten mejorar el desarrollo de los cultivos, cuando interactúan con las plantas, creando simbiosis entre sí. También están presentes en cerca del 95% de los cultivos agrícolas y

pueden aumentar los procesos de absorción y traslocación de nutrientes en las plantas (Rivera y Fernández, 2003).

En las cercanías de la raíz, los filamentos hifales son capaces de explorar volúmenes de suelo mucho mayores que las raíces no micorrizadas, estimulando de esta forma el crecimiento, reflejado en un aumento de la producción de masa aérea y radical. También pueden mejorar el aprovechamiento de los fertilizantes minerales y los nutrientes del suelo (Sánchez, 2001).

En la coinoculación *Rhizobium* - HMA - leguminosas se ha informado que las relaciones simbióticas proporcionan un mayor intercambio entre los simbiontes y efectos superiores a las plantas. En este caso la simbiosis *Rhizobium* - leguminosas aporta N₂ y las micorrizas incrementan la absorción de otros elementos, entre ellos el P, muy importante para garantizar una adecuada fijación biológica de N, aumentan el número, peso seco en los nódulos y el crecimiento de las plantas (Rivera y Fernández, 2003).

Desde el punto de vista productivo en la provincia de Guantánamo ha sido poco estudiado el uso de especies de abonos verdes como fuente alternativa de reciclajes de nutrientes, que permitan mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, en conjunto con la coinoculación de bacterias del género *Rhizobium* y hongos micorrízicos arbusculares.

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

¿Cómo responde *Canavalia* a la coinoculación con *Rhizobium* sp. y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado?

A partir de este problema, se estableció la siguiente **hipótesis**:

La coinoculación de *Canavalia* con aislados de *Rhizobium* sp. y cepas de hongos micorrízicos arbusculares incrementa el valor agronómico de esta especie.

Objetivo general

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

Objetivos específicos

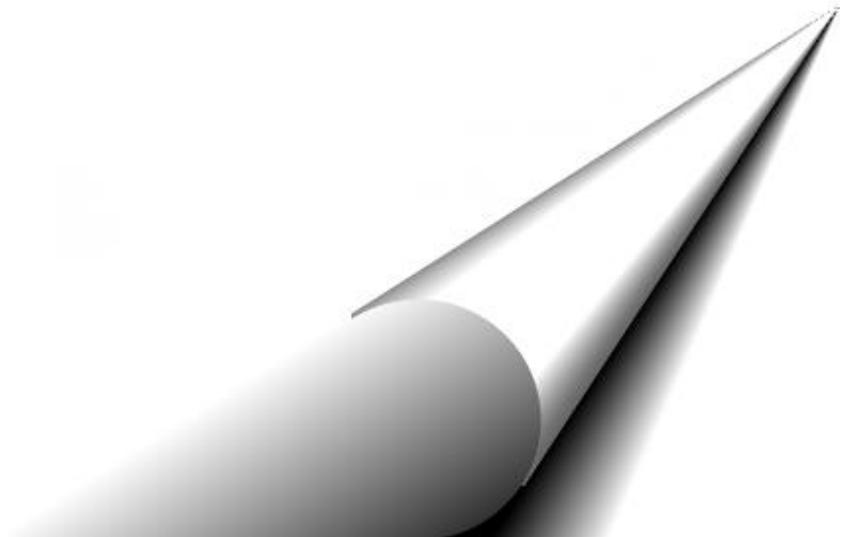
- Valorar la respuesta de *Canavalia* a la coinoculación de cuatro aislados de *Rhizobium* sp. y dos cepas de HMA.

- Evaluar las variables de funcionamiento fúngico y las relacionadas con la nodulación de *Rhizobium* sp. en Canavalia.
- Determinar los aislados de *Rhizobium* sp. y cepas de HMA más eficientes para Canavalia crecida en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado.

Novedad científica

Se determina en las condiciones de un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado de la provincia Guantánamo, el uso de *Canavalia ensiformis* coinoculada con aislados de *Rhizobium* sp. y cepas de HMA como fuente alternativa de incorporación y reciclaje de nutrientes al suelo, evaluando su valor agronómico.

Revisión Bibliográfica



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Abonos verdes. Definición y funciones

La práctica de los abonos verdes en la agricultura, es el cultivo de especies vegetales nativas o introducidas, perennes o anuales, asociadas y en rotación, consistiendo en la incorporación de la masa vegetal no descompuesta, con la finalidad de proteger, recuperar y mejorar las condiciones biológicas, físicas y nutricionales de los suelos (Ambrosano, 2001; Martín, 2009). Al descomponerse, los abonos verdes dan lugar a una serie de reacciones bioquímicas que incrementan la actividad microbiana de las rizosferas de las plantas, fomentando una mayor cantidad y diversidad de microorganismos, que se encargan de la mineralización de los elementos nutritivos. También, cuando son incorporados, favorecen la actividad de los microorganismos como hongos y bacterias que descomponen la celulosa, las que a su vez refuerzan con sus secreciones la consistencia de los agregados, que son necesarios para el correcto equilibrio del agua y del aire en el suelo (Peoples, 2004).

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

Las plantas utilizadas como abonos verdes generalmente pertenecen a la familia de las leguminosas, por la posibilidad que tienen éstas de fijar nitrógeno atmosférico en asociación con bacterias del género *Rhizobium* (Keng, 1996; Lloyd, 1997), aunque en los últimos tiempos se cultivan otras especies de crecimiento rápido y de buena producción de masa verde, como es el caso de algunas gramíneas, crucíferas o compuestas (Fancelli, 1990; Piamonte, 1993; Álvarez *et al.*, 1995; Sociedad de Agricultores de Chile, 2013).

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

- Estimulan de forma inmediata la actividad biológica y mejoran la estructura del suelo, mediante la acción mecánica de las raíces, por los exudados radicales, la formación de sustancias prehúmicas al descomponerse y la acción directa de las

células microbianas y micelios de hongos, asegurando altas producciones en las cosechas (Prager *et al.*, 2002).

- Reducen los costos de riego, debido a la acción de retención de la humedad del suelo mediante la cobertura que establecen, al mismo tiempo lo protegen de la erosión, factores que favorecen la reserva de agua (Madero *et al.*, 2003; Shoko, 2009).
- Aseguran la renovación del humus estable, acelerando su mineralización mediante el aporte de un humus más "joven" y más activo, estimulando la actividad biológica del suelo, al suministrar un sustrato para el desarrollo de los organismos (Sánchez de P, 2003; Dhima *et al.*, 2009).
- Evitan en gran medida el desarrollo y competencia de las arvenses, por el crecimiento vigoroso de la planta que impide el paso de luz, limitando su desarrollo (Prager *et al.*, 2002; Vázquez y Álvarez, 2011).
- En su descomposición, se liberan o sintetizan sustancias orgánicas fisiológicamente activas, que tienen una acción favorable sobre el crecimiento de las plantas y su resistencia al parasitismo (Gallego *et al.*, 2010).

En síntesis, los abonos verdes son alternativas de manejo para el mejoramiento de la fertilidad de la superficie cultivadas. Su uso se fundamenta en el aprovechamiento de la energía solar para producir masa vegetal de alta calidad nutricional, la cual, posteriormente se adiciona o incorpora con miras a incrementar el contenido de materia orgánica, con incidencia positiva sobre algunas propiedades físicas, químicas, biológicas de los suelos y rendimientos de los cultivos siguientes (Prager *et al.*, 2012).

2.1.1. Algunas características que deben reunir los abonos verdes

Estudios realizados por Álvarez (1993) y Sánchez de P *et al.* (2007) han referido que los abonos verdes deben poseer las siguientes características básicas.

- Excelente vitalidad y germinación de las semillas.

- Producción de abundante masa aérea y radical en períodos de corto tiempo, que sean de fácil incorporación, lo que contribuye a un efecto rizosférico que aumenta la disponibilidad de nutrientes y mejora la estructura del suelo.
- Su metabolismo fisiológico debe permitir que alcancen rápidamente la floración, etapa ideal para su incorporación.
- Las especies que se emplean como abonos verdes deben ser competitivas con la flora acompañante y de fácil adaptación a las condiciones del medio.

2.1.2. Características generales de la especie *Canavalia ensiformis*

Según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (2012) la *Canavalia* pertenece a la siguiente taxonomía:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Familia: *Fabaceae*

Sub - familia: *Faboideae*

Tribu: *Phaseolae*

Subtribu: *Diocleinae*

Género: *Canavalia*

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

Nombre común: Fríjol de puerco, fríjol de machete, haba de caballo, poroto sable y poroto gigante.

Es una planta nativa de América, encontrada en estado silvestre en Las Antillas y zonas tropicales africanas y asiáticas. Es muy rústica, anual o bienal, de crecimiento determinado cuando se desarrolla en condiciones de abundante luminosidad e indeterminado bajo sombra, en ambas condiciones puede alcanzar una altura de 0.6 a 1 m (Da Costa, 1991; Embrapa, 2007).

Sus raíces son pivotantes; tallos poco ramificados, glabros, de color púrpura, hasta 10 m de largo, volviéndose duros en la madurez; hojas trifoliadas, folíolos grandes, ovados a

elíptico-ovados, muy acuminados en el ápice, hasta 20 x 10 cm, glabros, verdes oscuros, brillantes, venas bien marcadas; inflorescencia colgante, hasta 30 cm de largo con 10-20 flores en abultamientos; flores grandes, 2,5 cm de largo, de color violáceo, rosado o blanco con base roja, cáliz tubuloso con los dientes muy desiguales, estandarte hasta 2.8 cm de largo, quilla recurvada hacia arriba; fruto hasta 30 x 3,5 cm, ensiforme, aplastado, algo recurvado, rostrado, con 2 o 3 costillas longitudinales cerca de la sutura superior, indehiscente; semillas 12-20, oblongas a redondas, algo aplastadas, 21 x 15 x 10 mm, lisas, blancas con un hilo largo de color café rodeado de una zona color castaño (Ulrike, 1997; Beyra *et al.*, 2004).

Se utiliza desde el punto de vista ecológico y económico debido a su elevada adaptabilidad a diversos ecosistemas y a su amplia utilización como suplemento nutritivo en la alimentación animal y humana, en la recuperación de los suelos, como abono verde, como cobertura por la gran cantidad de follaje que produce (neutralizando el surgimiento y desarrollo de los procesos de erosión) y como control de plagas y arvenses en la protección de cultivos (Bernal y Jiménez, 1990; Torres *et al.*, 1995).

La utilización de la *Canavalia ensiformis*, como recurso alimenticio está limitada por la baja digestibilidad de sus proteínas y por la presencia de factores antinutricionales tales como la concanavalina, la canavanina y los taninos; sin embargo existen evidencias del efecto positivo de algunos tratamientos como el remojo, la cocción y el tostado en la reducción de estos factores y en el aumento de la digestibilidad proteica (Oomah y Bushuk, 1983; Angulo *et al.*, 1986).

Según CIDICCO (2008); Espíndola *et al.* (1997) y Embrapa (2007) la *Canavalia* presenta un ciclo vegetativo que oscila entre 240 a 270 días, su germinación comienza a partir de los 2 a 3 días después de la siembra, se desarrolla con temperaturas de 15 – 30°C, precipitaciones de 640 – 4200 mm.año⁻¹, altura geográfica de 0 – 1800 msnm, excelente tolerancia a la sequía, moderada a la inundación y buena a la sombra, alta sensibilidad al fotoperíodo y su tasa inicial de crecimiento es rápida. La masa en floración pueda alcanzar de 13,6 – 60 t.ha⁻¹ de masa fresca y de 2,5 – 8,4 t.ha⁻¹ de masa seca, como mínimo, es capaz de fijar 49 kg N.ha⁻¹ derivado de la FBN y acumular en sus tejidos vegetales 57 kg N.ha⁻¹.

Para abono verde/cultivo de cobertura se siembra en surcos de 50 cm de distancia y 20 cm dentro del surco utilizando 150 - 180 kg.ha⁻¹ de semilla, asociado con cultivos, 4 plantas por m² (65 - 70 kg.ha⁻¹ de semilla), para producción de semillas se siembra en surcos de 1 m de distancia y 20 cm entre plantas (65 - 100 kg.ha⁻¹ de semilla), con profundidad de siembra entre 2 - 5 cm.

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

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

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

Según Bolaños (1995) y Borges (2009), las leguminosas pueden emplearse asociadas, intercaladas y en rotación con diferentes cultivos de interés agrícola.

En Cuba, con relación a las especies de leguminosas asociadas y en rotación con otros cultivos, los resultados experimentales han demostrado que los géneros *Mucuna*, *Dolichos*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria* son las más promisorias para su utilización, cuando se realiza un manejo apropiado y se observan sus peculiaridades. No obstante, diferentes autores (Zea, 1992; Zea *et al.*, 1993) coinciden en que *Canavalia* posee características sobresalientes para la siembra intercalada con maíz, debido a sus hábitos de crecimiento y a sus características morfológicas.

2.2. Efectos de los abonos verdes sobre las características físicas, químicas y biológicas del suelo

Efectos físicos:

Se ha demostrado que las características físicas más influenciadas por los abonos verdes son: agregación, capacidad de retención del agua, densidad, velocidad de infiltración y aireación (Breland, 1995; Keng, 1996). Por otra parte influyen además en la temperatura, mejoran la estructura, la textura y facilitan la penetración de capas endurecidas con raíces profundas (Astier *et al.*, 2006; Correa, 2010).

Diferentes estudios han corroborado que los abonos verdes protegen la capa superficial del suelo contra el impacto de las gotas de lluvia y el viento, disminuyen la evaporación del suelo, favorecen la aireación y estructuración del suelo por efecto del sistema radical, del proceso de transformación de la materia orgánica y de los microorganismos asociados a las raíces de los abonos verdes, entre ellos los HMA (Costa *et al.*, 1992; USDA, 1996; FAO, 2000; Mosavi *et al.*, 2009).

En estudios realizados por Fernández y Ortega (2000) sobre el efecto de la incorporación de dos abonos verdes sobre las características físicas del suelo, se informa que los abonos verdes reducen sensiblemente los valores de densidad aparente, porosidad total y macroporosidad, si se comparan con las condiciones iniciales del suelo, encontrándose diferencias significativas entre las edades de incorporación, lo que indica que el abono verde debe ser añadido al suelo iniciando el proceso de floración, incrementando la masa incorporada.

Blanchart *et al.* (2006), en estudios donde se usó una cobertura de *Mucuna pruriens* intercalada con una plantación de maíz (*Zea mays*); informaron pérdidas en el suelo con cobertura de 2,9 t.ha⁻¹.año⁻¹; reduciendo las pérdidas en 91% (31,1 t.ha⁻¹.año⁻¹) y 69 % (6,4 t.ha⁻¹.año⁻¹), con respecto a los suelos con labranza tradicional sin fertilización y labranza tradicional con fertilización mineral respectivamente. Estas diferencias indican los beneficios del uso de la especie sobre la conservación del recurso suelo.

Las gramíneas se han destacado por la eficiencia en la formación de agregados, a través de las acciones directas e indirectas de las raíces. Es por ello que uno de los métodos más adecuados para mejorar la estructura del suelo, es mediante la mezcla de una gramínea con

vigoroso sistema radical en constante renovación y una leguminosa que acelere la descomposición de los residuos vegetales (Álvarez *et al.*, 1995).

Efectos biológicos:

Se ha comprobado que los abonos verdes, al elevar los contenidos de materiales orgánicos en el suelo, estimulan la actividad biológica de las poblaciones microbianas, a través del reciclaje de nutrientes, determinante en la actividad de los microorganismos, constituyendo una fuente de energía para el desarrollo de poblaciones de bacterias fijadoras de N₂, tanto de vida libre como simbióticas.

Según Prager *et al.* (2002), los abonos verdes incorporados en el campo en estado de prefloración se convierten en masa rápidamente ciclada por los organismos del suelo, lo cual asegura disponibilidad temprana de nutrientes al cultivo establecido en asocio o rotación. Se aprovechan las fuentes de N provenientes de la mineralización y de la fijación biológica de N₂ (Gómez, 2000; Sánchez de P *et al.*, 2007; CIDICCO, 2008).

Tejada *et al.* (2007), investigaron el efecto de diferentes abonos verdes sobre las propiedades biológicas del suelo y el rendimiento de maíz (*Zea mays*), en un suelo Typic Xerofluent de España. Se obtuvo un incremento general en la tasa de respiración del suelo, en las parcelas donde se establecieron los abonos verdes, debido a su composición química y su relación C:N, en comparación con el tratamiento testigo, que redujo su tasa de emisión de CO₂ en el tiempo; posiblemente por disminución de la materia orgánica por la acción de la mineralización.

Por tanto, con la utilización de leguminosas como abonos verdes se incrementa la masa microbiana capaz de fijar nitrógeno atmosférico, siendo este último mayor o menor, en dependencia de factores como la cualidad de la bacteria, tipo de leguminosa y las condiciones generales de suelo, contribuyendo al desarrollo y actividad de la micro y macrovida del mismo, manteniendo de esta forma un equilibrio biológico.

Efectos químicos:

Los abonos verdes son importantes porque incrementan la calidad del suelo, mejoran la capacidad de intercambio catiónico (CIC), aumentan los contenidos de materia orgánica, mejoran el retorno de N a través de la fijación biológica de N₂, disminuyen el lavado de

nutrientes, pueden incrementar el pH, la acumulación del C orgánico y la mineralización del N y P orgánico, pudiendo complementar o sustituir fertilizantes de síntesis industrial (Prager *et al.*, 2002; Randhawa *et al.*, 2005; Lavelle, 2012).

Sanclemente *et al.* (2011), sostienen que los abonos verdes brindan ventajas como: incremento de los procesos de mineralización de la materia orgánica y liberación oportuna de nutrientes para el siguiente cultivo, adición de carbono orgánico que entra a formar parte del humus estable del suelo, lo que genera interacciones con el resto de las propiedades físicas, químicas y biológicas.

Por su parte, Lozano *et al.* (2011), informaron en sus análisis sobre el efecto de los abonos verdes en algunas propiedades químicas del suelo, incrementos tanto para la materia orgánica, N total, K y Ca, al incorporar los abonos verdes en comparación con las condiciones iniciales, concluyendo que el reciclaje realizado por los abonos verdes, en general, permite mejorar las condiciones del suelo en superficie, zona de importancia ya que es allí donde se encontrará la mayor densidad del sistema radical de los cultivos productivos.

2.2.1. Producción de masa seca y contenido de nutrientes

La selección de una especie de planta para ser utilizada como abono verde depende en gran medida de su tasa de crecimiento (Álvarez, 2000). Los abonos verdes deben ser rústicos, de crecimiento rápido y alta producción de masa, esto último depende de las condiciones edafoclimáticas y fitosanitarias (Filho *et al.*, 2004).

Para las condiciones de trópico se ha demostrado que la época de siembra óptima para esta especie coincide con la más lluviosa y de días largos (mayo - octubre), factores que favorecen un incremento vegetativo exuberante en períodos más cortos de tiempo y en la cual se ha observado un abundante crecimiento de las plantas, con promedios que oscilaron entre 3 - 11 t.ha⁻¹ de masa seca y aportes entre 150 - 250 kg N.ha⁻¹, en dependencia de las especies empleadas (García *et al.*, 2000a). En el período poco lluvioso, con días cortos y temperaturas bajas, el crecimiento y desarrollo de las plantas es mucho más lento y la masa total obtenida es baja, con promedios entre 0,8 - 1,8 t.ha⁻¹ de masa seca y aportes entre 25 - 50 kg.ha⁻¹ de N (García, 1997; Espíndola *et al.*, 1997).

Los abonos verdes en el verano crecen más rápido y acumulan más N, debido a la intensidad de la luz solar (Cherr *et al.*, 2006). Al aumentar las precipitaciones, se intensifica el crecimiento de las plantas empleadas como abono verde (Filho *et al.*, 2004) y a mayor producción de fitomasa, se incrementa el contenido de nutrientes (Perín *et al.*, 2004). Las especies promisorias utilizadas como abono verde deben aportar cantidades de fitomasa seca y N iguales o superiores a 5 t.ha⁻¹ y 100 kg.ha⁻¹ de N respectivamente, lo que favorece la actividad microbiana, contribuyendo a la aceleración de la descomposición de la materia orgánica, teniendo un impacto positivo sobre los cultivos y algunas propiedades del suelo (García, 1997).

2.2.2. Fijación biológica de nitrógeno por las leguminosas

La fijación biológica del Nitrógeno (FBN), constituye uno de los componentes primordiales de la sustentabilidad agrícola. La misma es realizada por un número limitado de especies procariotas, generalmente bacterias y algas verdes - azules (*Cyanophyceae*) y se manifiesta en diversos procesos, tanto simbióticos como no simbióticos. Dentro del grupo de microorganismos procariotas que establecen simbiosis con plantas pertenecientes a la familia *Fabaceae*, se encuentran las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, principalmente los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, las cuales infectan y nodulan las raíces de las plantas y dentro de los microorganismos de vida libre que establecen fijación no simbiótica del N se encuentran las bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Clostridium* y otras (Mayea *et al.*, 1991; Bauer, 2001).

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

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

Un requerimiento importante para la fijación de N₂ de forma asociativa en las leguminosas es la presencia de P asimilable, debido a que tiene un efecto fundamental en el intercambio del carbono, en la multiplicación de las bacterias y en el mismo proceso de fijación. El K también es necesario, pero en cantidades relativamente más pequeñas que el P, e incluso es suficientemente conocido que altas dosis del elemento impiden el desarrollo de las bacterias fijadoras. La falta de molibdeno (Mo), hierro (Fe), manganeso (Mn), boro (B), cobalto (Co) y calcio (Ca) es crítica y puede inhibir la capacidad de fijación. La presencia de amonio puede inhibir la fijación debido a que los microorganismos utilizan preferiblemente el N mineral en lugar del N₂ de la atmósfera (Martínez *et al.*, 2007).

2.2.3. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Entre los distintos sistemas biológicos que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (N₂), se destaca la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, que es el resultado de una interacción muy específica entre la bacteria y la planta, contribuyendo con el mayor aporte del elemento al ecosistema y a la producción de alimentos y se calcula que alcanza 20 % de la cantidad total del N fijada anualmente sobre el planeta (Martínez - Viera y Dibut, 2012).

Para que se establezca la simbiosis efectiva debe estar presente la especificidad entre las bacterias y las plantas hospederas, la cual ocurre en tres niveles: la habilidad para formar nódulos, la eficiencia para fijar nitrógeno y el grado en que la fijación simbiótica provee a la planta de sus requerimientos del elemento (Dazzo y Yanni, 2006).

Si bien la nodulación es una característica de las leguminosas en general, hay que decir que existen géneros que no forman tales estructuras.

Comúnmente, la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa provoca la formación del nódulo, en el cual se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico, mediante el proceso de infección, cuando las bacterias son estimuladas por los exudados radicales ricos en vitaminas, azúcares, enzimas y compuestos flavonoides, activándose varios procesos bioquímicos, que culminan con la formación del nódulo. Esta asociación es capaz de fijar de 24 a 584 kg.ha⁻¹ de N al año, siendo la más elaborada y eficiente entre las plantas y las bacterias (Martínez - Viera y Dibut, 2012).

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

2.2.4. Formación de nódulos en las leguminosas

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

Por otro lado, los nódulos radicales de las leguminosas son estructuras complejas, como ponen de manifiesto los estudios histológicos y fisiológicos, cuyo desarrollo y funcionamiento están regulados principalmente por la planta, la cual controla el número de nódulos mediante un mecanismo endógeno de retroinhibición o inhibición *feedback* y que se ha llamado de autorregulación, este mecanismo consiste en que, iniciado un número crítico de primordios nodulares, se bloquea la división celular en el córtex radical inhibiéndose el desarrollo de nuevos nódulos (Caba *et al.*, 2001; Fernández, 2008).

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

En los nódulos determinados la actividad meristemática cesa temprano en su formación y su aspecto final resulta del alargamiento de las células, este tipo de desarrollo origina nódulos esféricos o globosos en algunas especies de leguminosas (*Vigna unguiculata*, *Desmodium canum* y *Centrosema brasilianum*), otros pueden organizarse alrededor de la

raíz para formar los denominados nódulos en collar, peculiar de la *Canavalia* (Hirsch, 1992; Mayz, 1997; Mayz, 2004).

Los nódulos indeterminados presentan un meristema persistente, que puede producir nódulos ramificados o coraloides, puesto que constantemente se añaden nuevas células a la parte distal del nódulo; de tal manera que todos los estados de desarrollo están así representados, debido a que ocurre un gradiente de formación desde la parte distal, a la proximal en el punto de unión a la raíz. Este tipo de desarrollo da lugar a nódulos elongados o cilíndricos (*Indigofera hirsuta*, *Cajanus cajan*, *Crotalaria retusa*) y ramificados o coraloides (*Crotalaria retusa*, *Gliricidia sepium*) (Hirsch, 1992; Mayz, 1997; Mayz, 2004).

El color interno de los nódulos varía desde rojo hasta blanco y constituye una característica utilizada para medir la efectividad de la fijación. Cuando la simbiosis funciona con efectividad, tienen una coloración de rosada a roja debido a la presencia del pigmento leghemoglobina, cuya función consiste en regular los niveles de O₂ y aportar este elemento a las bacterias. Los nódulos de color claro indican en general poca o ninguna eficiencia en la fijación de N₂ (Martínez *et al.*, 2007).

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

2.3. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

El vocablo micorriza, proviene del griego *mykos*=hongo y *rhiza*=raíz, que literalmente significa hongo de la raíz, este término lo utilizó por vez primera el botánico de origen alemán Albert Bernard Frank, en 1885, para describir la unión de dos organismos que forman un solo órgano morfológico, en el cual existe una retroalimentación de los simbiontes (Agarwal y Sah, 2009).

Han sido uno de los microorganismos más estudiados debido a las asociaciones micorrízicas, a partir de la unión de estos con las raíces de las plantas. Las mismas están consideradas, según Barea *et al.* (1991); Madigan *et al.* (2004); Escobar *et al.* (2007) y

Fernández (2012) simbiosis universales, debido a que están presentes de manera natural, aproximadamente en el 85 % de las especies vegetales con interés agronómico.

Estos poseen dos sistemas de hifas, uno interno y el otro externo. El interno caracterizado por la penetración del hongo inter e intracelularmente en las células corticales de la raíz, el cual, en la corteza interna, da origen a arbuscúlos que se forman poco tiempo después de iniciada la colonización. El micelio externo, emerge de la raíz y se extiende por el suelo varios metros, dando lugar a hifas exteriores que constituyen el sistema de absorción de nutrientes y también muy importantes en el mantenimiento de la estructura del suelo, ya que constituyen redes que mantienen a los agregados o partículas del suelo unidos (Sieverding, 1991; Sánchez *et al.*, 2007).

Se ha demostrado con diversas investigaciones, que los HMA presentan amplia diversidad de asociaciones en la mayoría de las plantas superiores, atribuyéndoles beneficios a estas, como la estimulación del crecimiento debido al incremento en la absorción de P y otros nutrimentos esenciales para su desarrollo, tolerancia al estrés biótico y condiciones adversas al suelo entre otras (Brundrett, 2008; Aguilera-Gómez *et al.*, 2008).

2.3.1. Diferentes asociaciones micorrízicas

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

Las endomicorrizas no son detectadas visiblemente, forman una red externa de hifas y penetran el interior de las células corticales sin llegar a colonizar el endodermo. Es el grupo más difundido en el planeta y se divide en varios subtipos, de los cuales el más representativo es el arbuscular, caracterizado por formar arbuscúlos intracelulares y es sin duda el de mayor difusión e importancia económica y ecológica (Duchicela, 2001; Martín, 2009).

Los HMA durante su ciclo de vida, producen esporas que al germinar forman un micelio vegetativo y al hacer contacto con la superficie de la raíz se modifica en una protuberancia similar a un ventosa (apresorio), de donde surge la hifa que inicia la colonización de los tejidos radicales (Reyes-Jaramillo, 2002). Posteriormente, se forman hifas inter e intracelulares en las células corticales, que se van ramificando probablemente para introducir los carbohidratos procedentes de la planta y dan el aspecto de diminutos árboles llamados arbusculos (Aguilera-Gómez *et al.*, 2008).

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

2.3.2. Principales beneficios de los HMA en la nutrición de las plantas

El efecto más conocido que ejercen los HMA sobre las plantas a las que colonizan, es incrementar la absorción y traslocación de elementos esenciales (especialmente fósforo) por las hifas extrarradicales del hongo hacia la parte aérea de las plantas, fundamentalmente las que no se encuentran cercanas a la raíz; además sobre la tolerancia a estreses bióticos y abióticos, teniendo un efecto significativo en el crecimiento y desarrollo de la plantas (Jeffries *et al.*, 2003; Smith y Read, 2008).

Se ha confirmado que el micelio externo de los HMA puede absorber fosfatos (PO_4^-), nitritos (NO_3^-) y nitratos (NH_4^+) (Hodge *et al.*, 2001; Villegas y Fortín, 2002) y también micronutrientes como el zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo) y otros (Cardoso y Kuyper, 2006); sin embargo, el incremento en la toma de fósforo, es el beneficio más importante para la planta (Helgason y Fitter, 2009).

Por su parte Howeler (1985) y Netto (2008), informaron que el efecto más evidente de los HMA está en su papel sobre la nutrición de las plantas, provocado por un marcado incremento en los procesos de absorción y traslocación de nutrientes, ya sea por interceptación, flujo de masa o difusión, representado en los efectos sobre el crecimiento y la producción de las plantas.

Este beneficio puede ser resultado además del aumento de la superficie de exploración del suelo, elevación de la capacidad absorbente de las raíces, toma de nutrientes no accesibles a las raíces no micorrizadas, beneficio de otros microorganismos en la rizosfera, amortización de los efectos adversos del pH del suelo, salinidad, estrés hídrico y ataque de patógenos (Siqueira y Franco, 1988; Bonilla, 1999; Entry *et al.*, 2002; Bucher, 2007).

Hay que destacar que la mayoría de las plantas tienen dos vías de absorción de P, una llamada directa, que hace referencia a la interface raíz-suelo, y la otra llamada micorrízica o simbiótica que corresponde al fósforo que se intercambia en los arbusculos intracelulares formados por los HMA (Requena, 2005; Smith y Read, 2008).

En este caso, el micelio fúngico presenta una mayor eficiencia en la absorción de P por la amplia exploración física del suelo, llegando a zonas donde el fósforo no está accesible para ser captado por las raíces de las plantas. En la simbiosis, la toma del P por la hifa extraradical es el primer paso en la translocación de fosfato a la planta (Ohtomo y Saito, 2005; Olsson *et al.*, 2002; Takanishi *et al.*, 2009).

Los hongos micorrízicos arbusculares aumentan la capacidad de adquisición y de asimilación de recursos por parte de la planta hospedera, ya que en comparación con las raíces, las hifas externas de estos hongos poseen una mayor habilidad para explorar el suelo. La toma de nutrientes del suelo, principalmente fósforo, es favorecida por el diámetro y longitud de las hifas. Estos hongos pueden explorar una mayor extensión de suelo, lo que da como resultado una ventaja competitiva al hospedero debido a que resuelven las limitantes para la adquisición de nutrientes minerales que se difunden del ambiente radical y que se mueven lentamente en la solución del suelo (Bian *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2005).

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

- Incrementan el abastecimiento de nutrientes por el aumento en el volumen de suelo explorado y la adquisición de fuentes de nutrientes que normalmente no son disponibles para las plantas (Augé, 2001).

- Fuente de inóculo que favorece la colonización de raíces por los HMA, mejorando la protección frente a hongos o nematodos parásitos (Correa, 2010).
- Los beneficios pueden incluir conservación del suelo pues los agregados de mayores dimensiones formados por las hifas micorrízicas, mejoran la capacidad de retención de agua (Sánchez de P y Gómez, 2003).
- Cambios favorables en el crecimiento, en la arquitectura de la planta, el tejido vascular y otros (Miller *et al.*, 1995; Sánchez de P *et al.*, 2007).

2.3.3. Factores que afectan la colonización micorrízica

Los recientes progresos en los métodos para identificación y cuantificación de hongos micorrízicos arbusculares en suelo y dentro de raíces han permitido aclarar los factores que influyen su distribución. El desarrollo de las micorrizas arbusculares varía con el pH, tipo y profundidad del suelo, vegetación (especie, edad), grado de perturbación del sistema (Abbot y Robson, 1991; An *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993), contenido de humedad y materia orgánica del suelo, prácticas agrícolas como el uso de agroquímicos y rotación de cultivos (Jonson y Pflieger, 1992; Hepper y Warner, 1993; Entry *et al.*, 2002).

El nivel de fósforo, el uso y tipo de fertilizantes afectan grandemente la colonización micorrízica. Se ha establecido que a baja o moderada fertilidad del suelo, se mejora la respuesta de la planta. Asimismo, las aplicaciones excesivas de fertilizantes, sean de nitrógeno o fósforo, a menudo perjudican la colonización micorrízica, aunque en campo la respuesta es impredecible (Azcón y Barea, 1985). La colonización radical se reduce a muy altos o muy bajos niveles de fósforo disponible (Trimble y Knowles, 1995; Thomson *et al.*, 1991; Marschner y Dell, 1994), los efectos parecen estar mediados por la planta a niveles bajos y medios de N y P (Thomson *et al.*, 1991).

El grado de disminución o aumento en los niveles de colonización micorrízica arbuscular no solo depende del nivel de fósforo, sino también del nivel de nitrógeno suministrado, probablemente relacionado con la cantidad de carbohidratos presentes en la raíz. Asimismo se ha encontrado que las plantas de lechuga micorrizadas, obtenían un máximo nivel de colonización cuando el N se suministraba como nitrato, independientemente de la nutrición del fósforo (Marschner y Dell, 1994).

En los sistemas agrícolas existen efectos positivos sobre la colonización y producción de esporas cuando se maneja una adecuada rotación de cultivos, contrario a manejar una sola especie (Benthlenfalvay, 1991). En una rotación con soya (*Glycine max*), seguida de dos años de maíz (*Zea mays*), mijo (*Panicum miliaceum*) y nuevamente soya se obtuvo una alta densidad de población micorrízica de *Glomus* sp., contrario al monocultivo de soya por tres años (An *et al.*, 1993). En los ecosistemas naturales también hay una correlación positiva entre planta de cobertura y el número de esporas (Miller y Jastrow, 1994). Por otro lado, en la conversión de sistemas naturales a artificiales o viceversa, existen cambios en las especies de plantas y en el manejo de las especies, lo que afecta la microbiota del suelo y por consiguiente a las micorrizas (Kurlle y Pflieger, 1994).

2.3.4. Simbiosis *Rhizobium* - HMA- leguminosas

La simbiosis *Rhizobium* - HMA-leguminosa es de gran interés agronómico debido a que ambos simbioses cubren gran parte de los requerimientos de N y P que necesita la planta, mejoran el desarrollo de los nódulos y la fijación de nitrógeno, e incrementan el rendimiento de los cultivos y la eficiencia en el uso de los fertilizantes. También al incrementarse la absorción de fósforo por la micorriza, se mejora el desarrollo radical y el crecimiento de la planta y se acelera la maduración de las cosechas. Estas simbiosis son útiles para las leguminosas, cuyo requerimiento de fósforo es importante, ya que la micorriza le suministra el fósforo necesario para el desarrollo de las plantas y la fijación biológica (Rivera y Fernández, 2003; Fernández, 2012).

Las leguminosas coinoculadas con *Rhizobium* y micorrizas contienen un mayor porcentaje de carbono, nitrógeno, fósforo y materia seca superiores a las leguminosas inoculadas solamente con *Rhizobium* (Fernández, 2012).

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

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

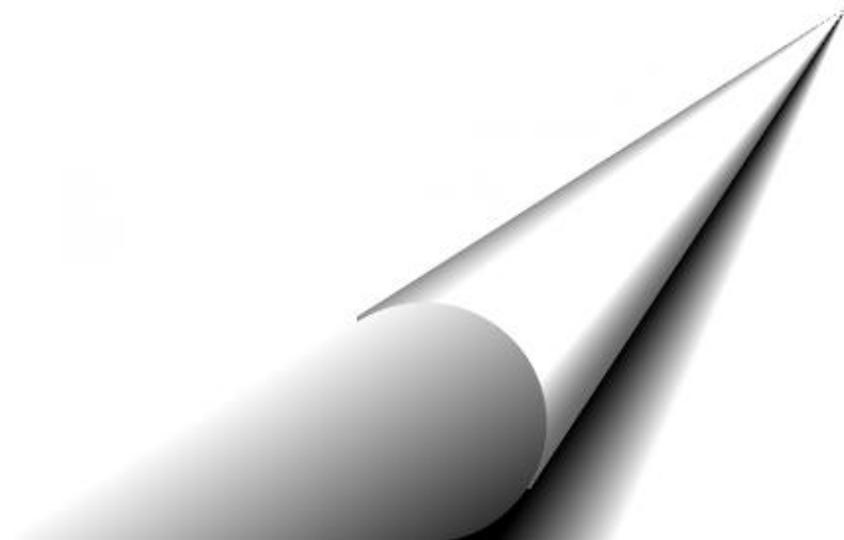
Los mismos autores, al experimentar con una cepa de *G. intraradices* que recientemente se reclasificaron taxonómicamente por Schüßler y Walker (2011) como *Rhizophagus intraradices* y una cepa de *Sinorhizobium meliloti* sobre la leguminosa alfalfa (*Medicago sativa*), señalaron que la técnica de tinción de raíces con azul de Tripán reveló un elevado porcentaje de colonización fúngica y una presencia muy importante de vesículas, resultando evidente la presencia de apresorios, puntos de entrada de la hifa fúngica en la raíz, además en el interior de los nódulos se observó un número importante de esporas y los puntos de entrada del micelio externo en el nódulo.

Por su parte, Ruiz *et al.* (2009), en suelos Pardos con Carbonatos, informaron que la coinoculación de cepas específicas de rizobios aisladas en la rizosfera de la Canavalia con una especie de HMA eficiente para este tipo de suelo, provocó los mayores incrementos de la masa seca de esta especie, lo que constituyó un resultado promisorio para obtener un mayor crecimiento, reciclaje, aporte de nutrientes y multiplicación de los microorganismos benéficos en el suelo a través del empleo de los abonos verdes coinoculados.

En relación a esto, Bustamante *et al.* (2010) informaron en un suelo Pardo sin Carbonatos, mediante la coinoculación de aislados de *Rhizobium* propios de Canavalia y hongos micorrízicos arbusculares, incrementos significativos en los indicadores de crecimiento evaluados en esta especie de planta. Resultados que acreditan que las relaciones simbióticas proporcionan un mayor intercambio entre los simbioses.

En general, se ha evidenciado que los HMA al producir una amplia red de micelios en el suelo, crean un nicho o sitio especializado para el desarrollo de bacterias y esta simbiosis interactúa estrechamente con diferentes grupos bacterianos. Al mismo tiempo, las rizobacterias también tienen una marcada influencia sobre el desarrollo de los hongos micorrízicos, los que pueden estimular la formación y el funcionamiento de los hongos, a través de la producción de compuestos flavonoides emitidos por las células radicales de las plantas, que facilita la penetración del hongo e incrementan los exudados de las raíces, estimulando a su vez el rápido crecimiento de las hifas, de manera que los dos microsimbiontes y el macrosimbionte se benefician mutuamente (Gryndler, 2000; Riera y Medina, 2005).

Materiales y Métodos



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Condiciones experimentales

Para alcanzar los objetivos propuestos se llevaron a cabo dos experimentos de campo en períodos diferentes (período lluvioso y período poco lluvioso) desde el 2010 a 2011, sobre un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado (MINAG, 1999), en dos áreas productivas pertenecientes al municipio El Salvador, provincia Guantánamo.

El primer experimento se desarrolló en el polígono docente de la Facultad Agroforestal de Montaña situado, en el km 6 ½, carretera Guantánamo - El Salvador, perteneciente a la Universidad de Guantánamo, en el período lluvioso (abril a julio de 2010). Las características químicas principales del suelo se observan en la tabla. 1.

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

pH H ₂ O	MO (%)	P (mg.kg ⁻¹)	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ⁺
6,9	3,04	216	(cmol. kg ⁻¹)			
			0,56	0,61	40,0	12,5

Determinaciones químicas:

pH H₂O potenciómetro: relación suelo/solución de 1:2,5; MO (materia orgánica) Walkley Black, P: solución 0.1 N de H₂SO₄ con relación suelo-solución 1: 25, Cationes NH₄Ac a pH 7 según Paneque *et al.* (2010).

El segundo experimento se desarrolló en la UBPC “Hermanos Sánchez”, que se encuentra ubicada en la porción este, Km 4 ½ carretera Guantánamo - El Salvador, perteneciente a la Granja Agropecuaria Honduras en el período poco lluvioso (noviembre de 2010 hasta febrero de 2011). Las características químicas principales del suelo se observan en la tabla 2.

Tabla 2. Algunas características químicas de la capa arable del suelo al inicio del experimento (0 - 20 cm de profundidad).

pH H ₂ O	MO (%)	P (mg.kg ⁻¹)	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ⁺
6,8	2,83	177	(cmol. kg ⁻¹)			
			0,50	0,51	35,0	19,0

Determinaciones químicas:

pH H₂O potenciómetro: relación suelo/solución de 1:2,5; MO (materia orgánica) Walkley Black, P: solución 0.1 N de H₂SO₄ con relación suelo-solución 1: 2,5, Cationes NH₄Ac a pH 7 según Paneque *et al.* (2010).

Las características del suelo para los dos experimentos (Tablas 1 y 2) fueron similares, con el pH fue ligeramente ácido. Presentó contenido medio y bajo de materia orgánica (MO). El fósforo (P) fue alto y probablemente se debió al método analítico que se utilizó para su determinación, que contiene una solución extraente de ácido sulfúrico que al reaccionar con el carbonato y el calcio del suelo, se libera el fósforo hacia la solución del suelo y por eso se sobreestima la cantidad de este elemento. Los contenidos de potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y sodio (Na) tuvieron valores altos para este suelo, sin embargo, el Na solo ocupó el 1% del complejo de intercambio, por lo que no manifiesta efectos adversos sobre los cultivos. Todas las evaluaciones se hicieron según las tablas de interpretación de análisis de suelo (Paneque y Calaña, 2001).

3.1.2. Condiciones climáticas de los períodos evaluados

La Tabla 3 describe los datos climáticos tomados en las Estaciones Meteorológicas más cercanas a las áreas donde se realizaron ambos experimentos. Se observa que el período lluvioso las variables climatológicas fueron favorables para el desarrollo del cultivo, destacándose en este sentido las precipitaciones, que pudieron influir de forma positiva en los resultados obtenidos, valores que están en correspondencia con la media histórica de la zona. Por otra parte, los datos climáticos en el segundo período disminuyeron en gran medida con respecto al período lluvioso, condiciones que pudieron estar determinados

por la época del año, donde predominan pocas precipitaciones y bajas temperaturas, coincidiendo con la media histórica de la zona.

Tabla 3. Comportamiento de las variables meteorológicas en el período evaluado

Período lluvioso			
Meses	T. Media.	H. Relativa.	Precipitaciones
	(°C)	(%)	(mm)
Abril	26,2	69	164,4
Mayo	27,5	73	190,8
Junio	27,9	78	106,9
Julio	27,9	77	111,6
Período poco lluvioso			
Meses	T. Media.	H. Relativa.	Precipitaciones
	(°C)	(%)	(mm)
Noviembre	24,5	73	96
Diciembre	21,6	74	65,9
Enero	23,7	75	65,1
Febrero	24,2	68	2

Temperatura media (T. Media); Humedad relativa (H. Relativa). Período lluvioso: Datos procedentes de la Estación Meteorológica Jamaiquita, ubicada en el Km 6 ½ carretera Guantánamo - El Salvador y a Km 1 ½ del área experimental (INSMET, 2010). Período poco lluvioso: Datos procedentes de la estación meteorológica Jobito, ubicada en el Km 6 ½ carretera Guantánamo – Sempré y a Km 2 del área experimental (INSMET, 2011).

3.2. Diseño experimental

En ambos períodos se empleó un diseño de bloques al azar con arreglo bifactorial y cuatro réplicas. Se estudiaron cinco niveles del factor inoculación de *Rhizobium* (cuatro aislados de *Rhizobium* más un tratamiento sin inoculación) y tres niveles del factor inoculación micorrízica (dos cepas y un testigo sin inoculación), para un total de quince tratamientos.

Se utilizó un área de 0,11 ha, distribuidas en 60 parcelas para ambas campañas, cada parcela experimental contó con cuatro surcos a una distancia de 0.70 m de camellón por 4 m de largo para un área de 11.2 m². La Canavalia se sembró de forma manual, a dos semillas por nido, a una distancia de narigón de 0.30 m. Las atenciones culturales se

hicieron según recomendaciones de Martín (2009). Para la toma de las muestras se seleccionaron, en el área de cálculo (dos surcos centrales), tres plantas completas por metro lineal, incluyendo el suelo de la rizosfera y las raicillas de las plantas, por cada tratamiento y réplica, dejando los dos surcos externos como área de borde, a los 70 días después de la germinación, durante la etapa de floración.

3.3. Métodos de inoculación de los biofertilizantes empleados

Como inoculantes micorrízicos se utilizaron las cepas *Glomus cubense* (Y. Rodr. y Dalpé), INCAM- 4 (Rodríguez *et al.*, 2011), (referida anteriormente como *Glomus hoi-like*) y *Glomus intraradices* (Smith y Schenck), INCAM- 11, que recientemente se reclasificó taxonómicamente por Schüßler y Walker (2011) como *Rhizophagus intraradices*, procedentes de la colección de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Las cepas se encontraban conservadas en un sustrato desarrollado para estos fines por el laboratorio de micorrizas del INCA (Registro de patente No.2264) a 4°C. Los inóculos de HMA utilizados en los experimentos poseían un título promedio de 50 esporas.g⁻¹ de suelo fresco, certificado en el Laboratorio de Micorrizas del INCA.

Como inoculante bacteriano se utilizaron cuatro aislados de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4 y Can 5), aislados por Hernández *et al.* 2012a. Los aislados provienen de nódulos de Canavalia y pertenecen a la colección de cepas de rizobios del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), se utilizaron a una concentración de 10⁷ a 10⁸ UFC.g⁻¹.

La coinoculación de estos biofertilizantes se realizó en el momento de la siembra, por el método de recubrimiento de las semillas (Metodologías descritas por Fernández *et al.*, 2000) utilizando una dosis de 5.95 kg.ha⁻¹ de EcoMic[®], equivalente al 10 % del peso de las semillas y 100 g de cada inoculante bacteriano. Primeramente se hizo una pasta homogénea, en una proporción de 1 kg de EcoMic[®] por cada 10 kg de semilla con las cepas de HMA separadas y posteriormente se les añadió cada aislado de *Rhizobium*. La inoculación simple del inóculo bacteriano se realizó mediante una solución azucarada,

luego se recubrió la semilla hasta quedar cubierta completamente, se pusieron a secar en la sombra durante 5 a 10 minutos y posteriormente se procedió a la siembra.

3.4. Evaluaciones realizadas y metodologías empleadas

✓ Análisis químico de suelo

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

Se utilizaron los métodos establecidos por Paneque y Calaña (2010), consistentes en: pH H₂O por el método potenciométrico, con relación suelo: solución de 1:2,5. Materia orgánica del suelo por el método colorimétrico de Walkley y Black. P asimilable (mg.kg⁻¹) por extracción con H₂SO₄ 0.1N con relación suelo: solución 1:2,5. Cationes intercambiables (cmol.kg⁻¹), por extracción con NH₄Ac 1 Mol.L⁻¹ a pH 7 y determinación por complejometría (Ca y Mg) y fotometría de llama (Na y K).

✓ Masa seca aérea

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

✓ Contenido de N,P,K

La concentración de N,P,K se determinó como porcentaje de la masa seca de la parte aérea por los siguientes métodos analíticos (Paneque *et al.*, 2010):

- Nitrógeno (N): digestión húmeda con H₂SO₄ + Se y determinación colorimétrica con el reactivo de Nessler.
- Fósforo (P): digestión húmeda con H₂SO₄ + Se y determinación colorimétrica por el método de Osmond.

- Potasio (K): digestión húmeda con H_2SO_4 + Se y determinación por fotometría de llama.

La extracción de N, P y K, se calculó a partir de los datos de la masa seca de la parte aérea y su correspondiente concentración de cada elemento (% N, P, K), por la siguiente fórmula: Extracción de N, P, K ($kg \cdot ha^{-1}$) = [MS parte aérea ($t \cdot ha^{-1}$) x concentración (%) del elemento en la MS de la parte aérea] x 10.

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

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

✓ **Colonización radical**

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

✓ **Densidad Visual**

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

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

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

Tabla 6. Transformación de los porcentajes de ocupación fúngica intrarradical en niveles, según Trouvelot *et al.* (1986).

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

✓ **Conteo de esporas de hongos micorrizicos arbusculares**

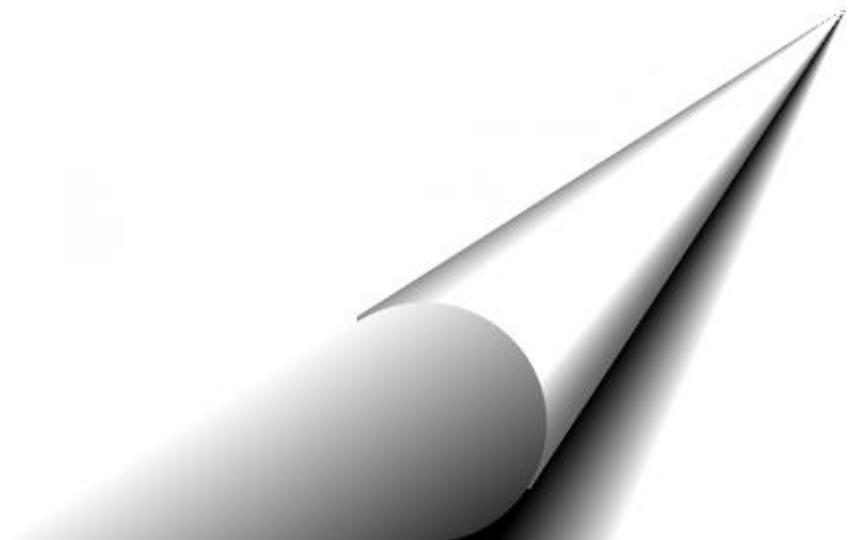
El conteo de esporas se realizó en muestras de 50 g de suelo de la rizósfera de las plantas colectadas, según el método de extracción descrito por Gerdeman y Nicolson (1963), modificado por Herrera *et al.*, (1995), basado en el tamizado y decantado por vía húmeda de los propágulos del hongo. Las esporas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

3.5. Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico se comprobó la normalidad de los datos 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).

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

Resultados y Discusión



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Masa seca aérea de Canavalia en los períodos estudiados

Al analizar el efecto de la coinoculación *Rhizobium* - HMA sobre la masa seca aérea de Canavalia, se observó interacción entre los factores de estudio a los 70 días después de germinada. La inoculación de *R. intraradices* combinada con el aislado Can 5 incrementó este indicador y fue superior al resto de las demás cepas, lográndose rendimientos de 7,12 y 6,2 t.ha⁻¹ de masa seca aérea para ambos períodos (**Figura 1**).

Por otra parte se encontró que la cepa *R. intraradices* en los tratamientos sin inoculación bacteriana y combinada con el aislado Can 4, mostraron el segundo mejor efecto positivo en relación a los demás tratamientos, en los dos momentos estudiados.

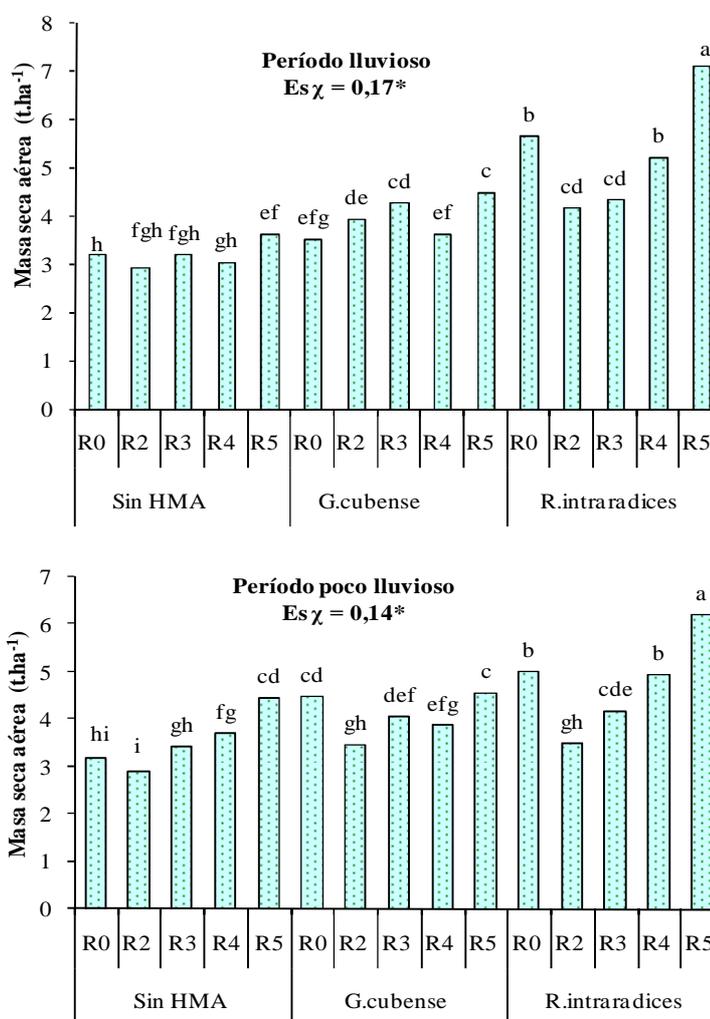


Figura 1: Producción de masa seca aérea. R0: sin *Rhizobium*, R2, R3, R4 y R5: aislados de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4 y Can 5). *Medias con letras distintas difieren entre sí, según prueba de Rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Sin embargo con la aplicación simple y combinada de *Rhizobium* y *G. cubense*, disminuyó la producción de masa seca aérea a 4,57 y 4,27 t.ha⁻¹ respectivamente, lo que indica que esta cepa de HMA manifestó menor efecto simbiótico que *R. intraradices*.

De esta manera, la mayor producción de masa seca aérea se obtuvo en el período lluvioso, resultados que están en correspondencia con días largos y con altas precipitaciones, en este caso osciló entre 164 y 190 mm en la región, lo que favoreció el incremento vegetativo de esta especie en un período menos prolongado. Sin embargo en el período poco lluvioso que osciló entre 65,9 a 96 mm, con días cortos y bajas temperaturas, pudo provocar la disminución de masa seca aérea.

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

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

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

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

kg.ha⁻¹ de N para este especie. Sin embargo, para la época de invierno (período poco lluvioso), Canavalia produce 0,84 t.ha⁻¹ de masa seca y 54,9 kg.ha⁻¹ de N, debido a que en esta época predominan temperaturas bajas y días cortos, condiciones que hacen que las plantas florezcan en períodos relativamente más tempranos, sin haber alcanzado el crecimiento vegetativo necesario, por lo que los aportes en materia seca y nutrientes son bajos comparados con los obtenidos en las condiciones de primavera.

También Martín *et al.* (2012), informaron resultados positivos de la inoculación *G. cubense* (cepa INCAM-4) sobre el funcionamiento micorrízico de Canavalia en su efecto de permanencia del cultivo del maíz para dos campañas diferentes (primavera y frío), el crecimiento de las plantas de este especie fue superior (primavera) con relación al invierno, alcanzando entre 2,24 - 4,58 t.ha⁻¹ y 2,82 - 5,38 t.ha⁻¹ de masa seca sin y con inoculación micorrízica respectivamente, con bajo número inicial de esporas nativas en el suelo y sin aplicaciones previas del inoculante micorrízico. En relación a la campaña de frío, la producción de masa seca disminuyó entre 1,34 a 1,35 t.ha⁻¹ y 1,60 a 1,70 t.ha⁻¹ respectivamente.

De forma general, los resultados informados por estos autores, son inferiores a los encontrados en esta investigación, debido a que las condiciones edafoclimáticas fueron diferentes y pudieron favorecer, tanto el desarrollo de las plantas, como las actividades simbióticas de los microorganismos.

Por su lado, García *et al.* (2000), al evaluar el aporte de fitomasa de diferentes abonos verdes incorporados en el cultivo de la papa, informaron que Canavalia obtuvo los mejores resultados de aportes de nutrientes y fitomasa con incrementos de 5,60 y 6,1 t.ha⁻¹ de masa seca con relación a los demás abonos verdes, variantes de fertilización mineral y testigo, respectivamente.

Investigaciones realizadas por Jiménez *et al.* (2005), en la producción de masa seca y contenido de nutrientes de plantas empleadas como abonos verdes, informaron que para obtener altas producciones de masa, deben ser favorables los factores como las propiedades

físico- químicas del suelo, la fisiología de las plantas, la época de siembra y el manejo del cultivo entre otros, lo que estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Martín *et al.* (2007), al evaluar el efecto de la Canavalia micorrizada con *G. hoi-like*, reclasificada por Rodríguez *et al.* (2011) como *G. cubense* (INCAM-4), en el cultivo del maíz, encontraron con respecto al barbecho, que Canavalia incorporó mayor cantidad de masa seca (9,76 t.ha⁻¹), número de esporas de HMA y se obtuvieron rendimientos significativamente mayores en las rotaciones donde se añadió esta especie.

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

Por otro lado, Puertas *et al.* (2008), en el establecimiento de cultivos de cobertura en suelo de trópico húmedo en la amazonía peruana, informaron que el porcentaje de cobertura alcanzado por Canavalia, fue superior a los demás cultivos, lográndose el cubrimiento total del suelo a los 90 días después de la siembra con un incremento de masa aérea de 4,59 t.ha¹.

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

En cuanto a las respuestas de los tratamientos inoculados por las diferentes cepas de HMA, se ha informado anteriormente por Simó *et al.* (2009), efectos de la inoculación micorrízica de Canavalia con la cepa de HMA *G. intraradices* actualmente *R. intraradices* (Schüßler y Walker, 2011) en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado, atribuidos a incrementos de la masa verde y seca y del contenido de nutrientes de las plantas inoculadas respecto a los tratamientos no inoculados, lo que demuestra el efecto positivo de la inoculación micorrízica sobre las especies de abonos verdes, al aumentar su valor agronómico.

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

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

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

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

4.2. Extracción de nutrientes

Según se observa en la **Tabla 7**, en las dos campañas, nuevamente *R. intraradices* en combinación con el aislado Can 5, mostró los mejores resultados sobre la extracción de nutrientes de Canavalia, existiendo interacción entre los factores de estudio, con valores de 136 kg.ha⁻¹ de N, 13,71 kg.ha⁻¹ de P y 49,77 kg.ha⁻¹ de K para el período lluvioso, mientras

que el período poco lluvioso la extracción de N presentó valores de 93,44 kg.ha⁻¹ de N y de 10,35 kg.ha⁻¹ de P, en correspondencia con los resultados obtenidos en el crecimiento de la masa seca aérea (**Figura 1**).

Por otra parte, se debe destacar el incremento de este indicador en presencia de *R. intraradices* sin inoculación de rizobios, con respecto a los aislados Can 2, Can 3 y Can 4 para ambos períodos, debido a la aparente existencia de cepas residentes de *Rhizobium*, que probablemente fueron más efectivas en establecer la simbiosis en presencia de *R. intraradices*, que los aislados inoculados, exceptuando a Can 5. Así mismo se refleja este incremento en los tratamientos sin inoculación bacteriana y sin HMA, posiblemente debido a la compatibilidad de cepas residentes, tanto de *Rhizobium* como de HMA, capaces de establecer simbiosis con el macrosimbionte, tan efectivas como las coinoculadas.

Otras de las causas de estos resultados, se deben a los efectos de la simbiosis HMA – leguminosa, especialmente la cepa *R. intraradices*, que ha sido la más recomendada para este tipo de suelo, de manera que pudo mejorar los procesos de absorción de nutrientes, provocando en este sentido, mayor crecimiento de las plantas y por tanto, mayor posibilidad de absorber nutrientes del suelo.

En este sentido, Trannin *et al.* (2000) han observado que las hifas interceptan las raíces de las leguminosas y se asocian para un incremento de la transferencia de nutrientes entre el simbionte y su hospedero, dando contraste a un mejor comportamiento de la simbiosis micorrízica, estimulando el desarrollo vegetativo de esta especie.

Los efectos encontrados por la inoculación micorrízica sobre los nutrientes indicaron la importancia y beneficios de la simbiosis efectiva sobre la nutrición de las plantas más que sobre un elemento en particular, como ya fue señalado por Sánchez (2001) y Rivera y Fernández (2003).

Tabla 7. Efecto de la inoculación simple y combinada de *Rhizobium* y HMA sobre la extracción de nutrientes (masa seca aérea) de N,P,K de Canavalia a los 70 días ddg.

Tratamientos		Período lluvioso			Período poco lluvioso	
		N	P	K	N	P
		kg.ha ⁻¹			kg.ha ⁻¹	
Sin HMA	R0	71,76fghi	5,63ef	25,59i	49,49ij	4,70fg
	R2	63,43i	5,75ef	26,03i	45,95j	4,46g
	R3	71,47ghi	5,23ef	32,72fghi	52,58ghij	5,07efg
	R4	66,03hi	4,97f	34,81efgh	59,11efgh	6,27cdef
	R5	78,24defg	5,07f	36,80defgh	71,04cd	6,52bcd
<i>Glomus cubense</i>	R0	77,06efgh	6,26def	37,92defg	66,97cde	6,57bcd
	R2	79,14defg	7,11cde	31,44fghi	58,66efgh	5,26defg
	R3	87,69de	8,85bc	42,08cd	71,60c	6,06cdefg
	R4	81,26defg	6,75def	38,32def	62,54def	5,54defg
	R5	90,08d	5,24ef	41,11cde	70,32cd	6,27cdef
<i>Rhizophagus intraradices</i>	R0	121,13b	8,16bcd	44,96bc	84,99b	6,98bc
	R2	84,66de	6,88def	26,82hi	51,11hij	5,68defg
	R3	83,98def	7,89cd	26,47hi	54,99fghi	7,04bc
	R4	104,09c	9,81b	31,23ghi	61,46efg	7,61b
	R5	136,26a	13,71a	49,77a	93,44a	10,35a
Es χ		3,77*	0,60*	2,06*	2,81*	0,53*

*Medias con letras distintas en la misma columna difieren entre sí, según prueba de Rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). R0: sin *Rhizobium*, R2, R3, R4 y R5: aislados de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4 y Can 5 respectivamente). ddg: días después de la germinación.

Por otra parte, la fotoperiodicidad es una de las características propias de este cultivo, pues crece más en condiciones de días largos, elevadas temperaturas y precipitaciones, propia de la campaña de primavera o épocas de lluvias del clima de Cuba. Esto pudo ser otra causa que influyó en estos valores.

Sánchez *et al.* (2009), informaron en sus estudios realizados en campañas diferentes, sobre el contenido de nutrientes de varias especies de abonos verdes en suelos Cambisoles, que Canavalia alcanzó alrededor de los 150 kg.ha⁻¹ de N, 12 kg.ha⁻¹ de P y 50 kg.ha⁻¹ de K, comparada con las demás especies de abonos verdes estudiadas.

Por su parte, Martín *et al.* (2010) informaron resultados donde Canavalia tuvo respuesta a la inoculación con diferentes cepas de HMA en suelo Ferralítico Rojo, dado a los efectos superiores de extracción de nutrientes e incrementos de masa seca cuando se inoculó con *G. hoi-like* respecto al testigo sin inoculación, dado a los efectos que tienen los HMA en la mejora de la absorción y el contenido de nutrientes por parte de la planta hospedera.

Con respecto a la extracción de nutrientes Puertas *et al.* (2008), informaron que Canavalia presentó (173,68 kg.ha⁻¹ de N, 15,86 kg.ha⁻¹ de P y 68,46 kg.ha⁻¹ de K) superiores a las otras especies vegetales usadas como cobertura en suelo de trópico húmedo en la amazonía peruana, atribuido a que Canavalia desarrolla con mayor eficiencia la capacidad fijadora de nitrógeno por ser un cultivo que está bien adaptado a la zona de trópico y por tener mayor especificidad con las bacterias que fijan nitrógeno, además de la mayor producción de masa foliar y a la concentración de este elemento en sus tejidos.

Similar a esto, Treto *et al.* (2001), notificaron que en las condiciones de Cuba, de manera general, los abonos verdes se destacan por hacer un aporte de N al sistema superior a los 100 kg.ha⁻¹ de N.

Por otra parte, Córdova *et al.* (2011), en resultados obtenidos al evaluar la fijación biológica de nitrógeno por tres leguminosas en condiciones de campo, informaron que las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo sean mejores, éstas favorecen una mejor exploración de las raíces y asimilación de nutrientes, en compañía de las relaciones simbióticas de las cepas residentes de *Rhizobium* presentes en el suelo, incidiendo en la mayor formación de nódulos efectivos, los que al realizar más captación de N atmosférico contribuyen al aumento de este en la parte aérea de las plantas.

Por su parte, Martín *et al.* (2012), en resultados obtenidos sobre el funcionamiento micorrízico con *G. cubense* en Canavalia, informaron diferencias significativas con la

inoculación micorrízica en relación al crecimiento y extracción de nutrientes entre las dos campañas evaluadas (primavera y frío), reflejado en el mayor contenido nutricional con 176 kg.ha⁻¹ de nitrógeno, 9,80kg. ha⁻¹ de fósforo y 108 kg.ha⁻¹ de potasio en el período lluvioso. Castillo *et al.* (2010), al evaluar tres leguminosas como coberturas asociadas con maíz (*Zea mays*) en el trópico subhúmedo, informaron que la cantidad de masa seca y los contenidos de nutrientes de los tratamientos con incorporación de Canavalia fue superior a la vegetación natural en los dos años estudiados.

Por otra parte, Urquiaga y Zapata (2000), informaron que algunas especies de leguminosas tropicales utilizadas como abonos verdes, pueden hacer una acumulación aproximadamente de 1 kg.ha⁻¹.día⁻¹ de N hasta los 60 – 70 días de crecimiento. En el caso de Canavalia, hasta el 96 % de este N proviene de la FBN, cuantificado por el método de la abundancia natural de ¹⁵N.

En estudios realizados en Colombia sobre la contribución de la fijación biológica de N en el cultivo de Haba (*Vicia faba*) y su efecto residual en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*), Kantar *et al.* (2010) informaron que la Haba produjo alrededor de 8,5 t.ha⁻¹ de materia seca, acumulando 191 kg.ha⁻¹ de N, de los cuales el 90 % (172,4 kg.ha⁻¹) correspondió a la contribución de la fijación biológica.

Es de señalar, que aunque no se cuantificó FBN en este trabajo, se puede decir que el 1 % de la materia orgánica de un suelo equivale al 20 kg.ha⁻¹ N para cultivo de ciclo corto (Yagodin, 1986), entonces los resultados permiten presuponer que las condiciones experimentales favorecieron el proceso de FBN, debido que el aporte ofrecido por el suelo fue muy bajo, con valores que oscilaron entre 56,6 a 60,8 kg.ha⁻¹ de N y las cantidades del elemento encontrado en la Canavalia fueron mucho más elevadas.

4.3. Nodulación de Canavalia en los períodos evaluados

La **Tabla 8** muestra la interacción entre los factores en estudio (*Rhizobium* - HMA) en la nodulación de Canavalia. Se observaron respuestas significativas de las variables a la coinoculación de ambos microorganismos, con efecto superior la cepa *R. intraradices* con respecto a la cepa *G. cubense* y el testigo sin inocular, donde nuevamente la combinación de

R. intraradices con el aislado Can 5 incrementó significativamente estos indicadores para los dos períodos. En este tratamiento se observó una relación de 735,5 y 983,66 de nódulos totales así como 99,88 y 97,76 % de nódulos efectivos y 53,86 y 29,0 de masa de los nódulos, en el período lluvioso y poco lluvioso respectivamente.

Estos resultados coinciden con el mejor tratamiento para la producción de masa seca aérea (Figura 1) y la extracción de nutrientes (Tabla 7) antes analizadas, lo que indica que la alta nodulación y efectividad obtenida con el aislado Can 5, se tradujo en contenido de N foliar.

La nodulación de Canavalia con inoculación simple de *Rhizobium* fue alta para los dos períodos de estudio, sin embargo fue inferior con respecto a los tratamientos coinoculados, debido al efecto beneficioso ejercido por la asociación tripartita.

Los compuestos exudados por las raíces de la Canavalia (flavonoides, compuestos fenólicos, aminoácidos, entre otros) propician la proliferación de los rizobios en la rizosfera, lográndose la adherencia y la colonización de las raicillas, la formación de los nódulos y su posterior efecto positivo, lo que pudo influir en estos resultados.

Se observó además, que en el período lluvioso la nodulación de Canavalia fue superior en relación al poco lluvioso. Respecto a este resultado se plantea, que es posible que en las condiciones de invierno, que coinciden con el período poco lluvioso, se produce una limitación de carbono en los nódulos de las leguminosas que podría ser la causa del descenso de la fijación de nitrógeno en los mismos (Martínez - Viera y Dibut, 2012).

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

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

de nódulos, masa de los nódulos y mayores contenidos de N y P en las plantas (Rivera y Fernández, 2003).

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

Tabla 8. Efecto de la inoculación simple y combinada de *Rhizobium* y HMA en la nodulación de *Canavalia* a los 70 ddg.

Tratamientos	Período lluvioso			Período poco lluvioso			
	Nódulos totales (u)	Masa seca nódulos (g por planta)	Efectividad (%)	Nódulos totales (u)	Masa seca nódulos (g por planta)	Efectividad (%)	
Sin HMA	R0	433,66k	19,93j	95,16	416,5k	14,92i	86,80
	R2	528,66i	26,8gh	96,54	463,5ij	24,45cde	88,71
	R3	555,0h	27,83g	97,32	507,25gh	22,72efg	90,03
	R4	506,33j	23,3i	97,84	439,0jk	20,92gh	87,05
	R5	585,33g	29,33fg	98,43	485,75hi	21,87fgh	91,83
<i>Glomus cubense</i>	R0	510,66ij	23,763hi	96,37	436,5jk	17,01i	92,19
	R2	621,33f	31,53f	97,12	575,25de	27,75ab	94,83
	R3	587,66g	28,43fg	98,43	539,0fg	24,17def	93,52
	R4	650,33de	37,8de	98,50	606,0cd	26,75abc	94,35
	R5	670,0cd	39,9cd	98,90	631,75bc	27,72ab	95,74
<i>Rhizophagus intraradices</i>	R0	642,33ef	36,13e	98,12	488,75hi	19,64h	95,98
	R2	664,66cd	39,16de	98,90	516,0gh	24,81cde	95,88
	R3	684,66c	42,96c	98,87	563,25fg	26,02bcd	96,00
	R4	787,33b	47,23b	98,49	662,75b	28,50ab	96,30
	R5	983,66a	53,86a	99,98	737,5a	29,0a	97,76
Es χ	7,31*	1,07*		11,15*	0,81*		

*Medias con letras distintas en la misma columna difieren entre sí, según prueba de Rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). R0: sin *Rhizobium*, R2, R3, R4 y R5: aislados de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4 y Can 5 respectivamente). ddg: días después de la germinación.

López *et al.* (2000) y Sousa *et al.* (2007), al caracterizar la nodulación en leguminosas, informaron que el número de nódulos y la masa de los nódulos de las especies expresaron correlación significativa, producto a la eficiencia del proceso de nodulación y la fijación de N₂ con poblaciones inoculadas de *Rhizobium*.

Asimismo, Claudia *et al.* (2008) informaron interacción entre diferentes cepas de *Rhizobium* y hongos micorrízicos arbusculares en especies de leguminosas en un Andisol, donde todas las cepas nodularon, pero sólo se observaron nódulos efectivos de color rojo a rosado en las raíces principales, los que probablemente se encontraban fijando N₂ por la presencia de la leghemoglobina.

Pérez *et al.* (2008), informaron que la inoculación de Canavalia con los aislados Can 2, Can 3 y Can 5 provocan un marcado incremento en la nodulación y el crecimiento de Canavalia crecida en suelo Ferralítico Rojo.

Resultados obtenidos por Bustamante *et al.* (2009; 2010), en suelos Pardos sin Carbonatos, informaron que el aislado Can 3 propició incrementos de 1 106 en el número de nódulos totales de Canavalia con respecto al testigo sin inoculación, y en el caso de la coinoculación con cepas de *Rhizobium* y HMA en Canavalia, la inoculación con la cepa 2003a y *G. moseae* aumentó el número de nódulos efectivos en Canavalia.

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

Duodu *et al.* (2009), informaron que las plantas leguminosas inoculadas con *Rhizobium* y hongos micorrízicos arbusculares, contienen un mayor porcentaje de carbono, nitrógeno, fósforo y materia seca que las leguminosas inoculadas solamente con *Rhizobium*. Esta interacción simbiótica con los hongos micorrízicos resulta beneficiosa para las leguminosas, cuyo requerimiento de fósforo es importante para el desarrollo de la nodulación y el crecimiento en estas plantas (Claudia *et al.*, 2008).

Ramírez (2011), estudiando el comportamiento de tres especies de abonos verdes en un suelo franco de la serie Maracay en Venezuela, informó que había nódulos abundantes en Canavalia previo a la floración en la época de primavera con respecto a *Crotalaria* (*Crotalaria juncea*) y Frijol Terciopelo (*Mucuna pruriens*), que disminuyeron la producción de nódulos. Los autores atribuyeron estos efectos a la efectividad de las especies de *Rhizobium* inoculadas en Canavalia que se adaptaron a las condiciones existentes en el suelo.

Puerta *et al.* (2008), informaron que la masa de nódulos fue superior en Canavalia seguida de *Crotalaria* en comparación al resto de las leguminosas, basado a que éstas dispusieron de mayor cantidad de asimilados para la formación de los nódulos.

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

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

4.4. Variables del funcionamiento fúngico.

4.4.1. Colonización micorrízica y densidad visual de Canavalia en los períodos evaluados

En la **Tabla 9**, se observa el efecto de la interacción entre los factores en estudio sobre el porcentaje de colonización micorrízica y densidad visual de Canavalia en los dos períodos evaluados. Se encontró una marcada tendencia a valores superiores de colonización y densidad visual en tratamientos inoculados con cepas de HMA, con respecto a aquellos sin inoculación micorrízica. En todos los casos, los porcentajes de colonización presentan valores por encima del 30 % y en los tratamientos más destacados, alcanzan valores superiores al 60 %. Igualmente la densidad visual, indicador que describe el grado de intensidad con la que el hongo coloniza la raíz, osciló entre 9,26 y 9,47 % en los tratamientos inoculados.

En este caso, *R. intraradices* en combinación con el aislado Can 5, mostró los mejores resultados de colonización micorrízica y densidad visual con valores de 81,73 y 9,47 % en el período lluvioso y 77,67 y 9,26 % en el período poco lluvioso. Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos en la producción de masa seca aérea y extracción de nutrientes presentados en la Figura 1 y Tabla 7. Este comportamiento pudo estar determinado por la especificidad que se estableció entre el tipo de suelo y el HMA, lo que produjo un mayor grado de compatibilidad entre los simbioses, lo cual parece indicar que *R. intraradices* de conjunto con el aislado Can 5 sean las más eficientes en estas condiciones.

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

Tabla 9. Efecto de la interacción de *Rhizobium* y HMA sobre la colonización micorrízica y la densidad visual para *Canavalia* en los períodos evaluados.

Tratamientos		Período lluvioso		Período poco lluvioso	
		Colonización (%)	Densidad visual (%)	Colonización (%)	Densidad visual (%)
Sin HMA	R0	56,53f	2,34j	41,70g	1,06h
	R2	49,20g	3,5hij	43,87g	1,99h
	R3	59,43ef	4,11ghi	47,33fg	2,63gh
	R4	44,04g	2,77hi	41,84g	1,8h
	R5	64,77cde	4,81fgh	58,98cde	3,41fg
<i>Glomus cubense</i>	R0	61,78def	5,14efg	59,23cde	4,63cde
	R2	62,25def	5,87def	54,15ef	5,18cd
	R3	56,08f	5,93def	64,31bc	5,01cde
	R4	56,46f	4,73fgh	56,23de	4,57de
	R5	67,66cd	5,87def	53,50ef	4,39def
<i>Rhizophagus intraradices</i>	R0	70,62bc	7,76b	67,21b	6,30b
	R2	67,00cd	6,97bc	64,34bc	5,67bc
	R3	74,58b	6,89bc	66,29bc	4,62cde
	R4	64,73cde	6,58bcd	62,50bcd	5,45bcd
	R5	81,73a	9,47a	77,67a	9,26a
Es χ		2,26*	0,50*	2,46*	0,33*

*Medias con letras distintas en la misma columna difieren entre sí, según prueba de Rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). R0: sin *Rhizobium*, R2, R3, R4 y R5: aislados de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4 y Can 5 respectivamente). ddg: días después de la germinación.

Por otro lado, se evidenciaron incrementos significativos para estos indicadores en los tratamientos de inoculación simple y aquellos que no fueron inoculados, lo que indica la presencia de cepas residentes de ambos microorganismos, que son compatibles con el cultivo y que tienen respuesta similar o superior a la coinoculación de los aislados de *Rhizobium* y cepas de HMA en Canavalia para los dos períodos.

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

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

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

Los resultados encontrados en esta investigación están en similitud con los obtenidos por Marrero (2010), cuando evaluó la colonización micorrízica de *G. intraradices* en suelos

Pardos Mullidos Carbonatados y encontró porcentajes de colonización micorrízica entre 66 y 70 %, valores que indicaron una micorrización efectiva.

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

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

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

González *et al.* (2012), en la coinoculación de cepas de *Rhizobium* y una cepa de hongo micorrízico arbuscular (*Glomus cubense*) en suelo Ferralítico Rojo Lixiviado, informaron que los tratamientos inoculados con *G. cubense* mostraron incrementos de la colonización

micorrízica, la densidad visual y la densidad de esporas en la rizosfera de las plantas, significativamente mayores que los no inoculados, al mismo tiempo, estas variables fúngicas alcanzaron valores más altos cuando la inoculación de *G. cubense* se combinó con una u otra cepa de *Rhizobium*.

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

Por otra parte, Parra (2012) en estudios realizados sobre el efecto de *Rhizobium* y micorrizas arbusculares en el desarrollo de *Cajanus cajan* empleado como abonos verdes, en suelos naturales de la localidad de Espino, estado Guárico, informó que los valores sobre los porcentajes colonización micorrízica y densidad visual más altos, fueron encontrados en los tratamientos con la doble coinoculación, en comparación con los demás tratamientos donde solo se hizo una aplicación por separado.

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

4.4.2. Número de esporas de HMA en la rizosfera de *Canavalia* en los diferentes períodos evaluados.

En la **Figura 2**, se aprecian los valores obtenidos de número de esporas en 50 g de suelo presente en la rizosfera de *Canavalia*, en el período lluvioso y poco lluvioso, a los 70 días después de germinada, en la cual se puede observar la interacción entre los factores en estudio. De manera general existió un incremento del número de esporas en los tratamientos coinoculados con respecto al testigo sin inocular, destacándose las combinaciones de *R. intraradices* con el aislado Can 5 para los dos períodos, alcanzando un valor de 1 237 esporas por 50 g de suelo en el primer momento, siendo superior al segundo momento (698,64 esporas).

Este indicador logró reflejar los efectos de la coinoculación de estos dos microorganismos, no solo expresado en los porcentajes de colonización, densidad visual y masa seca aérea (Figura 1 y Tabla 9), sino también en un mayor número de esporas en la rizosfera de las plantas.

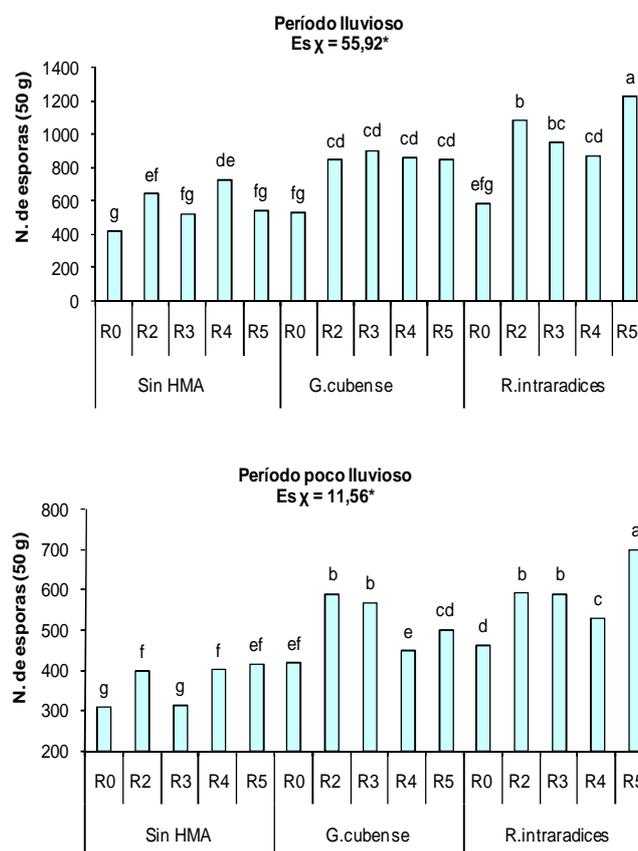


Figura 2: Número de esporas de HMA en la rizosfera de *Canavalia*. R0: sin *Rhizobium*, R2, R3, R4 y R5: aislados de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4, Can 5 respectivamente). *Medias con letras distintas difieren entre sí, según prueba de Rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$).

Estos resultados se reafirman en los análisis de correlaciones en los dos períodos evaluados Tablas 10 y 11, al encontrarse correlaciones significativas ($P < 0,05$) o altamente significativas ($P < 0,01$) entre las diferentes variables evaluadas, indicando que la masa seca aérea, la extracción de nutrientes y el funcionamiento micorrízico estuvieron correlacionados entre sí, existiendo una respuesta positiva de la Canavalia a la coinoculación de aislados de *Rhizobium* y cepas de HMA a los 70 días después de la germinación.

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

Además se observó que en el período lluvioso se incrementó el número de esporas en relación al poco lluvioso, sin embargo en el primer momento no se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos, exceptuando la coinoculación de *R. intraradices* con el aislado Can 5, probablemente debido a las condiciones edafoclimáticas, que fueron favorables en el período lluvioso, permitiendo un mejor funcionamiento simbiótico entre los organismos involucrados, de manera que tuvo un efecto similar entre los tratamientos. Sin embargo en el período poco lluvioso las condiciones edafoclimáticas son adversas, que pudieron influir en la disminución del efecto simbiótico, en tal sentido los tratamientos coinoculados puedan tener efectos diferentes en la micorrización.

Tabla 10. Matriz de correlaciones entre la masa seca aérea, las variables de funcionamiento micorrízico y las extracciones de macronutrientes en la masa seca aérea de Canavalia sobre el suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado en el período lluvioso.

Variables	MS (t.ha ⁻¹)	Extracción (kg.ha ⁻¹)			Colonización (%)	Densidad visual (%)
		N	P	K		
Extrac. N (kg.ha ⁻¹)	0.986(**)					
Extrac. P (kg.ha ⁻¹)	0.883(**)	0.845(**)				
Extrac. K (kg.ha ⁻¹)	0.636(*)	0.687(**)	0.457			
Colonización (%)	0.812(**)	0.778(**)	0.627(*)	0.375		
Densidad visual (%)	0.909(**)	0.876(**)	0.824(**)	0.523(*)	0.872(**)	
Esporas (No. 50 g suelo ⁻¹)	0.620(*)	0.518(*)	0.685(**)	0.246	0.491	0.707(**)

* Significativa $P < 0,05$. ** Significativa $P < 0,01$.

Tabla 11. Matriz de correlaciones entre la masa seca aérea, las variables de funcionamiento micorrízico y las extracciones de macronutrientes en la masa seca aérea de Canavalia sobre el suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado en el período poco lluvioso.

Variables	MS (t.ha ⁻¹)	Extracción (kg.ha ⁻¹)		Colonización (%)	Densidad visual (%)
		N	P		
Extrac. N (kg.ha ⁻¹)	0.893(**)				
Extrac. P (kg.ha ⁻¹)	0.947(**)	0.789(**)			
Colonización (%)	0.784(**)	0.701(**)	0.786(**)		
Densidad visual (%)	0.792(**)	0.741(**)	0.789(**)	0.797(**)	
Esporas (No. 50 g suelo ⁻¹)	0.539(*)	0.457	0.642(**)	0.843(**)	0.928(**)

* Significativa $P < 0,05$. ** Significativa $P < 0,01$

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

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

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

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

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

Rivera *et al.* (2010), en el cultivo del cafeto con el empleo de los abonos verdes en suelo Fersialítico Rojo Lixiviado, plantearon que el número de esporas de los hongos micorrízicos arbusculares se incrementa significativamente en el suelo, producto del crecimiento de los abonos verdes, encontrándose una positiva relación lineal entre la masa seca de los abonos verdes a los 70 días después de germinados y las cantidades de esporas de HMA en el suelo al momento de incorporarlo.

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

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

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

4.5. Consideraciones generales

El uso de leguminosas como fuente alternativa de incorporación de nutrientes, de conjunto con el empleo de biofertilizantes a base bacterias fijadores de nitrógeno y de hongos micorrízicos arbusculares, constituye un resultado promisorio para mejorar la eficiencia en la absorción de agua y nutrientes por los cultivos y multiplicación de estos microorganismos en el suelo, son opciones que permiten incrementar la producción agrícola de forma ecológica y que sustituyen en gran medida la utilización de los fertilizantes minerales.

Es importante señalar que la aplicación de inoculantes micorrízicos, más que una alternativa, es un modelo para hacer agricultura, su justo valor está en lograr que se alcance una simbiosis efectiva a través del papel de los HMA en la potenciación de la nutrición de las plantas, de manera que la función principal de la simbiosis es aumentar las posibilidades de absorción del sistema radical (Marrero, 2010).

Por otra parte, la coinoculación de *Canavalia* con dos tipos de microorganismos benéficos del suelo, en este caso una bacteria y un hongo, potenció el crecimiento y desarrollo de la planta y al mismo tiempo, los microorganismos no fueron antagonicos entre sí, ratificándose su efecto mutualista, lo que puede ser empleado de manera efectiva dentro de los sistemas de producción.

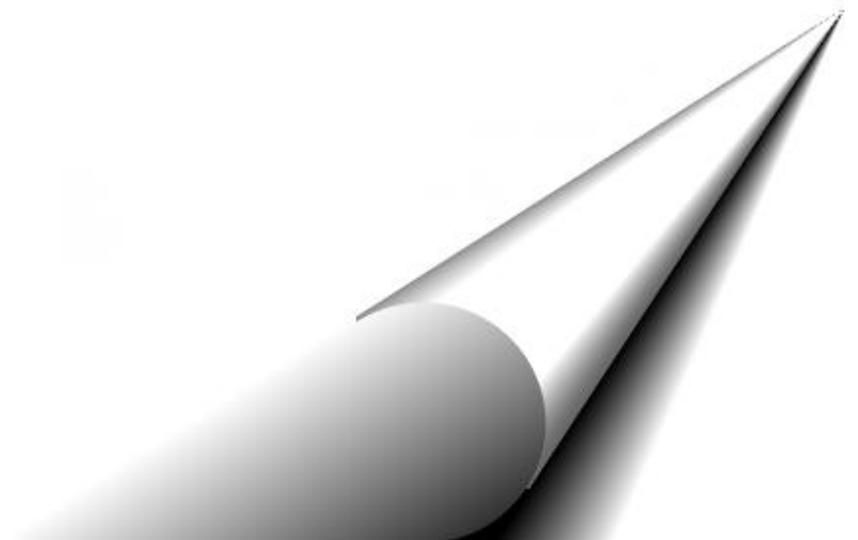
Los resultados demuestran como la especie *Canavalia ensiformis* (L) D.C fue capaz de responder a la coinoculación de *Rhizobium* sp. y hongos micorrízicos arbusculares en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado, obteniéndose resultados superiores con estas combinaciones con respecto a los que se obtienen en algunos tratamientos con inoculación simple y en presencia de cepas residentes de *Rhizobium* sp. y HMA en el suelo, que en algunos casos fueron tan eficientes como las introducidas. De manera que para este tipo de suelo, el aislado de *Rhizobium* sp. Can 5 proveniente de nódulos de *Canavalia* y la cepa de HMA *Rhizophagus intraradices* resultaron ser las más efectivas, lo que ratifica el efecto de la alta especificidad cepa de HMA – tipo de suelo.

Estos resultados se corroboran con los obtenidos por Sánchez (2001); Ruiz (2001); Rivera y Fernández (2003) y Rivera *et al.* (2006), quienes informaron que la cepa *G. intraradices* actualmente *R. intraradices* ha funcionado adecuadamente en los suelos Pardos con

Carbonatos, para diversos cultivos, bajo el concepto de que el tipo de suelo, es el criterio fundamental para definir cuál o cuáles son las especies y cepas eficientes para una condición edafoclimática dada, con independencia del tipo de cultivo existente, lo que indica una baja especificidad cepa eficiente de HMA – cultivo. La explicación de este proceso significa que la cepa eficiente para una condición edáfica dada, establece una simbiosis efectiva con cualquier cultivo dependiente de la micorrización que se establezca en ese suelo.

En este sentido se evidenció la acción beneficiosa de la simbiosis tripartita entre los microorganismos y el macrosimbionte, de manera que se refleja en el crecimiento y el aumento de la masa seca aérea y de los demás indicadores evaluados en Canavalia lo que constituye una alternativa útil para una agricultura orgánica y sostenible, debido a su alto beneficio nutricional y ecológico, para elevar los rendimientos agrícolas de diferentes cultivos. De manera general el uso de los biofertilizantes con las leguminosas y en especial Canavalia, es una alternativa que permite trabajar en un enfoque de una agricultura orgánica – sostenible, basado en el uso de los abonos verdes y microorganismos benéficos, que pueden garantizar altas producciones de los cultivos agrícolas con menores costos, una mayor calidad biológica de las cosechas, aumento de la actividad biológica del suelo, además de minimizar el uso de los fertilizantes químicos, en función del cuidado del medio ambiente y que puede ponerse en práctica en diversas condiciones y modelos de producción agrícola, ya sea por diferentes empresas estatales o a niveles de productores, lográndose impactos positivos en la producción agrícola.

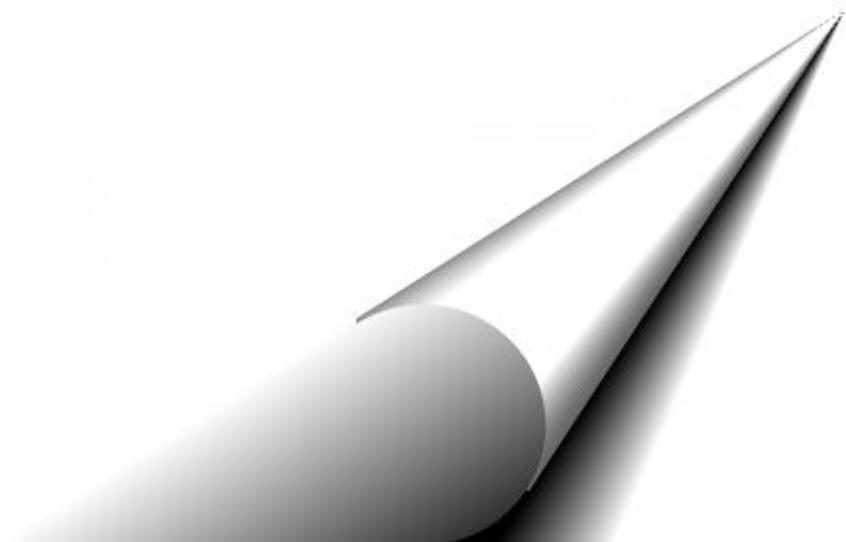
Conclusiones



V. CONCLUSIONES

- El crecimiento y desarrollo de la Canavalia se incrementó en presencia de la coinoculación de aislados de *Rhizobium* sp. y hongos micorrízicos arbusculares, expresados en la producción de masa seca de la parte aérea que osciló entre 6,2 t.ha⁻¹ para el período poco lluvioso y 7,12 t.ha⁻¹ para el período lluvioso.
- La coinoculación de la Canavalia con *Rhizobium* sp. y hongos micorrízicos arbusculares, incrementó las variables de funcionamiento fúngico, que oscilaron entre el 77,67 y el 81,73 % de colonización radical y 9,26 a 9,47 % de la densidad visual, así como las relacionadas con la nodulación de *Rhizobium* sp., lográndose de 737,5 a 983,66 de nódulos totales; con 97,76 a 99,88 % de efectividad de los nódulos y de 29,0 a 53,86 de masa de los nódulos.
- El aislado Can 5 combinado con la cepa de HMA *Rhizophagus intraradices*, se comportaron como los microorganismos más eficientes para la inoculación de *Canavalia ensiformis* cultivada en suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado, al garantizar los mayores acumulados de masa seca de la parte aérea, extracción de nutrientes, nódulos efectivos, porcentajes de colonización micorrízica, densidad visual y número de esporas, siendo mayor su efecto en el período lluvioso.
- En las condiciones de estudio, *Canavalia ensiformis* tuvo una mejor respuesta a la coinoculación de *Rhizobium* sp. y hongos micorrízicos arbusculares en el período lluvioso con relación al período poco lluvioso para los indicadores evaluados.

Recomendaciones

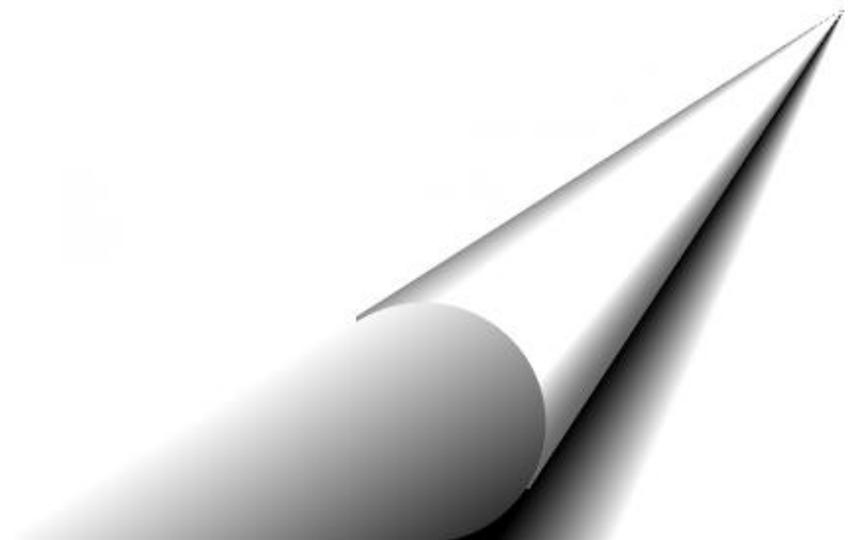


VI. RECOMENDACIONES

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

- Emplear el aislado de *Rhizobium* sp. Can 5 y la cepa de HMA *Rhizophagus intraradices* para la coinoculación eficiente de Canavalia en suelos Pardo Sialítico Mullido Carbonatado.
- Extender a diferentes formas de producción y a niveles de productores, el uso de la Canavalia coinoculada con los aislados de *Rhizobium* sp. y las cepas de hongos micorrízicos arbusculares seleccionadas respectivamente.
- Realizar estudios de aislamiento y caracterización de las cepas residentes de ambos microorganismos en los sitios donde se realizaron los experimentos.
- Que los resultados de este trabajo, sean utilizados como material de consulta para estudiantes de pre y postgrado, productores e investigadores de la rama agrícola.

Referencias Bibliográficas



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, L.K.; Robson, A.D. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular-mycorrhizas Agric. Ecosystems Environ. 35: 121-150.
2. Agarwal, P.; Sah, P. 2009. Ecological importance of ectomycorrhizae in world forest ecosystems. Nature and Science. 7: 107-116.
3. Aguilar, N. 2005. Efecto del abono verde de *Canavalia ensiformis* (Canavalia) en sistemas agrícolas. Centro de Información Documental Agropecuaria (CIDAGRO), Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). 7p.
4. Aguilera-Gómez LI.; Olalde-Portugal V.; Arriaga MR.; Contreras, A. R. 2008. Micorrizas Arbusculares. Ciência Ergo Sum. 14: 300-306.
5. Álvarez, M. 2000. Los abonos verdes: una alternativa para la producción sostenible de maíz en las condiciones de los suelos Ferralíticos Rojos de la Habana. Tesis de Maestría en Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. UNAH. La Habana. 69 p.
6. Alvarez, M.; García, M.; Treto, E. 1995. Los abonos verdes: una alternativa natural y económica para la agricultura. Cultivos Tropicales. 16 (3): 9-24.
7. Ambrosano, E. 2001. Técnica para marcação do adubo verde *Crotalaria juncea* com ¹⁵N para estudos de dinâmica do nitrogênio. En: XV Congreso Latinoamericano y V Cubano de la Ciencia del Suelo. Programa y Resúmenes. Comisión V. Fertilidad y Nutrición. Boletín de la Sociedad Cubana de la Ciencia del Suelo (4): 230 p.
8. An, Z.Q.; Hendrix, J.W.; Hershman, D.E.; Ferris, R.S.; Henson, G.T. 1993. The influence of crop rotation and soil fumigation on a mycorrhizal fungi community associated with soybean. Mycorrhiza. 3: 171-182.
9. Angulo, J.; Carre, B.; Harcoast, J.; Picard, M. 1986. Composición química y papel de aminoácidos del grano de *Canavalia ensiformes* como recurso para la alimentación animal. XXXVI Convención Anual de ASOVAC. Caracas. Venezuela. Suplemento. 1: 153-163.

10. Astier, M.; Maass, J.; Etchevers, B.; Peña, J.; González, F. 2006. Short-term green manure and tillage management effects on maize yield and soil quality in an Andisol. *Soil and Tillage Research*. 88: 153-159.
11. Augé, R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis, en *Mycorrhiza*. 11: 3-42.
12. Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M. 1985. Effect of soil microorganisms on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84: 536-537.
13. Barea, J.M.; Azcón-Aguilar, C.; Ocampo, J.A.; Azcón, R.1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas arbusculares. En: *Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. II. Fijación de N y Micorrizas*. Madrid: CSIC. 149-173.
14. Barrera, T. 2010. Uso y manejo de leguminosas y su aporte a la sostenibilidad de sistemas de producción en zonas tropicales. Postgrado en Ciencia del Suelo, Universidad Central de Venezuela. Maracay.13 p.
15. Barrios, E.; Mahuku, G.; Navia, J.; Cortés, L.; Asakawa, N.; Jara, C.; Quintero, J. 2006. Green manure impact on nematodes, arbuscular mycorrhizal and pathogenic fungi in tropical soils planted to common beans. En: *World Congress of Soil Science (18th :2006, July 9-15, Philadelphia)*.
16. Bauer, T. 2001. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: familia *Rhizobiaceae*. Disponible en: <http://www.microbiologia.com.ar/suelo/Rhizobium.html>. Consultado en noviembre de 2012.
17. Bautista, F.; Delgado, D.; Estrada, H. 2008. Effect of legume mulches and cover crops on earthworms and snails. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8: 45-60.
18. Beltrán, A.; Fenech, L.; Ruiz, F.; Zamora, S.; Murillo, B.; García, J.L.; Troyo, E. 2004. *Tópicos selectos de agronomía*. Edit. CIBNOR – UABCS. La Paz, B.C.S. México. 260p.
19. Bernal, H.Y.; Jiménez, L.C. 1990. Haba criolla. *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. (*Fabaceae– Faboideae*). Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello (SECAB). Bogotá, Colombia. 531p.

20. Beyra, A.; Matos, G.; Reyes, A. 2004. Revisión taxonómica del género *Canavalia* DC. (Leguminosae papilionoideae) en Cuba. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas*. 28 (107): 157-175.
21. Biederbeck, V.O.; Zentne, R.P.; Campbell, C.A. 2005. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1775 – 1784.
22. Blanchart, E. ; Villenave, C. ; Viallatoux, A. ; Barthès, B. ; Girardin, C. ; Azontonde, A. ; Feller, C. 2006. Long-term effect of a legume cover crop (*Mucuna pruriens var. utilis*) on the communities of soil macrofauna and nematofauna, under maize cultivation, in southern Benin. *European Journal Soil Biology*. 42: 136- 144.
23. Bolaños, J. 1995. Productividad con conservación. Estrategias para la productividad sostenible de maíz en laderas. En *Memorias Taller de Productividad y Conservación de los Recursos en la Agricultura de Ladera*. Centro Internacional de Mejoramiento Maíz y Trigo. IICA. San Salvador. 94 p.
24. Bonilla, R. 1999. Influencia de las micorrizas sobre suelos aldoneros deteriorados en Codazzi y San Juan del Cisa. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Disponible en: <http://200.13.202.26:90/pronatta/proyectos/pdf/951200235res.pdf> . Consultado mayo de 2012.
25. Borges, M. 2009. Influencia de la *Canavalia ensiformis* (L) D.C en algunas propiedades de un suelo Ferralítico Rojo. Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Ciencias del Suelo. Universidad Agraria de la Habana. 60 p.
26. Breland, T. 1995. Green manuring with clover and Ryegrass catch crops undersown in spring wheat. Effects on soil structure. *Soil use management*. 11(4):163-167.
27. Brundrett, M. C. 2008. Mycorrhizal Associations: The Web Resource. Disponible en: <http://mycorrhizas.info/vam.html>. (Consultada en Mayo de 2013).
28. Bucher, M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*. 173 (1): 11 – 26.
29. Bustamante, C.; Pérez, A.; Viñals, R.; Rivera, R.; Pérez, G.; Rodríguez, M. 2009. Efecto de la inoculación con cepas de *Rhizobium* sobre indicadores de crecimiento y producción de masa por *Canavalia ensiformis* intercalada con cafeto en suelo Pardo de

- Cuba. Presentaciones. Taller Nacional de la Red Temática de Simbiosis Micorrízica 25 al 27 de noviembre de 2009. Memorias. CD – ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
30. Bustamante, C.; Rivera, R.; Pérez, G.; Viñals, R. 2010. Promoción del crecimiento de *Canavalia ensiformis* L. mediante la coinoculación de cepas de *Rhizobium* y hongos formadores de micorrizas en suelo pardo sin carbonatos. *Café y Cacao*. 9 (2): 5 p.
 31. Caba, J.M.; Poveda, J.L.; Ligeró, F. 2001. Control de la nodulación en las leguminosas: Implicación de las fitohormonas. Disponibles en: <http://193.146.205.198/sefin/Ligeró.html>. Consultado en febrero de 2012.
 32. Cardoso, I; Kuiper, T. 2006. "Mycorrhizas and tropical soil fertility." *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 116: 72-84.
 33. Castillo, J. B.; Maldonado, J.A.; Jiménez, J. J.; Zúñiga, F.; Amaya-Castro, M. J.; Rodríguez, R. 2010. Evaluación de tres Leguminosas como coberturas asociadas con Maíz en el Trópico Subhúmedo. *Agronomía mesoamericana*. 21(1):39-50.
 34. Cedeño, I. F. 2010. Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares residentes sobre el desarrollo y estado nutritivo del Palmito (*Bactris gasipaes* HBK) en etapa de vivero. Tesis presentada en Opción al Título de Ingeniero Agropecuario. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. 108 p.
 35. Cherr, C.M.; Scholberg, J.M.S.; Sorley, M. 2006. Green manures as nitrogen source for sweet corn in a warm – temperate environment. *Agron. J.* 98: 1173 – 1180.
 36. CIDICCO. 2008. Especies utilizadas como Abono verde o Cultivo de Cobertura. Disponible en: <http://www.cidicco.hn/especies/canavalia.html>. (Consultado en Abril de 2013).
 37. Claudia, G.; Castillo, R.; Rubio, H.; Urzúa, S.; Fernando, B. 2008. interacción *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* y hongos micorrízicos en un andisol con diferentes niveles de saturación de aluminio. IDESIA. Chile. Septiembre – Diciembre. 26(3):7-179.
 38. Código Internacional de Nomenclatura Botánica, Wikipedia, 2012. Disponilbe en: http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%B3digo_Internacional_de_Nomenclatura_Bot%C3%A1nica. <23 – 1 – 09>. Consultado en octubre de 2012.

39. Corbera, J.; Nápoles, M. 2013. Efecto de la inoculación conjunta *BradyRhizobium elkanii*-hongos MA y la aplicación de un bioestimulador del crecimiento vegetal en soya (*Glycine max* (L.) Merrill), cultivar INCASOY-27. Cultivos Tropicales. 34 (2): 5-11.
40. Córdova, S.; Estrada, M.; García, S.; López, J. D.; Núñez, J. A.; Cabriales, J. J.; Espinoza, L. C.; Navarro, R. 2011. Biological nitrogen fixation by three *fabaceas* (*Leguminosae*) in acid soil of Tabasco, Mexico. AIA. 15(1): 31-50.
41. Córdova-Sánchez, S.; Cárdenas-Navarro, R.; Peña-Cabriales, J. J.; Estrada, M.; Lobbit, C.; Núñez, J. A. 2013. Fijación biológica de nitrógeno por cuatro fabáceas en suelos ácidos de Tabasco, México. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. 45 (1): 1-9.
42. Correa, Y. R. 2010. Estudio preliminar de la capacidad de un suelo para retener gases con efecto invernadero (GEI) en un ciclo de cultivo de maíz (*Zea mays* L.) bajo abonos verdes. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 61 p.
43. Costa, M.; Calegari, A.; Mondardo, A.; Bulisani, E.A.; Wildner, L. DO P.; Alcântara, P.B.; Miyasaka, S.; Amado, T.J.C. 1992. Adubação verde no sul do Brasil. Rio de Janeiro, ASPTA. 346 p.
44. Da Costa, M. 1991. Adubacao verde no sul do Brasil. Rio de Janeiro.
45. Dazzo, F.B.; Yanni, Y.G. 2006. The Natural *Rhizobium* Cereal Crop Association as an Example of Plant- Bacteria interaction. In Biological Approaches to Sustainable Soil Systems, Taylor and Francis Ed., Boca Ratón. 109-128 p.
46. Deguchi, S.; Shimazaki, S.; Uozumi, S.; Tawaraya, K.; Kawamoto, H.; Tanaka, O. 2007. White clover living mulch increases the yield of silage corn via arbuscular mycorrhizal fungus colonization. Plant and Soil. 291 (1): 291-229.
47. Dhima, K.; Vasilakoglou, J.; Gatsis, Th.; Panou-Philotheou, E.; Eleftherohorinos, I. 2009. Effects of aromatic plants incorporated as green manure on weed and maize development. Field Crops Research. Vol. 110, No.3, 235-241p.
48. Duchicela, J. 2001. Proyecto de Tesis. Evaluación del uso de Endomicorrizas vesículo arbusculares (MVA) en la obtención de plántulas de tomate de árbol *Solanum betaceum* Cav. ESPE-Facultad de Ciencias Agropecuarias. Sangolquí. Ecuador.

49. Duodu, S.; Brophy, C.; Connolly, J.; Svenning, M.M. 2009. Competitiveness of native *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain for nodule occupancy is manifested during
50. Embrapa, Agrobiología. 2007. Base de datos. Leguminosas. Disponible en: http://intranet2.cnpab.embrapa.br/leguminosas/detalhes_busca.asp?cod_id=12&tema=r esumo. (Consultado en noviembre de 2012).
51. Entry, I.A.; Rygiewicz, P.T.; Watrud, L.S.; Donnelly, P.K. 2002. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas. *Advances in Environmental Research*. 7: 123 – 138.
52. Escobar- Acevedo, J.C.; Zuluaga-Pelaez JJ.; Colorado-Gasca G.; Paez, D. 2007. Micorriza vesícula arbúscular. Recurso microbiológico para desarrollar una agricultura sostenible. Programa nacional de Transferência de Tecnología Agropecuaria. Bogotá, Colombia. 20 p.
53. Espíndola, J.A.A.; Guerra, J.G.M.; de Almeida, D.L. 1997. Adubação verde: estratégia para uma agricultura sustentável. Seropédica. Embrapa, Agrobiología. Documentos 42. 20 p.
54. Fancelli, A.L. 1990. Adubacao verde. Piracicaba: ESAQ/USP
55. FAO. 2000. Manual de prácticas integradas de manejo y conservación de suelos. Boletín de Tierras y Aguas de la FAO, No. 8. Disponible en: http://www.fao.org/ag/ags/AGSE/agse_s/7mo/iita/iita.htm. (Consultado en octubre de 2012).
56. Federico N.; Spagnoletti, A.; Fernández, P.; Natalia, E.; Viviana, M. 2013. Las micorrizas arbusculares y *Rhizobium* una simbiosis dual de interés. *Rev Argent Microbiol*. 45(2):131-132 p.
57. Feng, Y.; Yang X.; Stoffella.; He, PJ. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 339-353.
58. 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.

59. Fernández, F.; Gómez, R.; Vanegas, L. F.; Noval, B. M. de la; Martínez, M. A. 2000. Producto inoculante micorrizógeno . Oficina Nacional de Propiedad Industrial. Cuba, Patente no. 22641.
60. Fernández, N.; Ortega, L. 2000. Efecto de la edad de incorporación de dos abonos verdes sobre algunas propiedades del suelo y el rendimiento del rábano (*Raphanus sativus*). Venesuelos. 10(1 y 2):18-31.
61. Fernández, W. 2008. Fijación biológica del nitrógeno. Disponible en: <http://www.monografias.com>. Consultado en abril de 2013.
62. 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.
63. 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.
64. Gallego J.; Prager, M., Sánchez de P. 2010. Efectos de dos abonos verdes sobre la mineralización del nitrógeno y la dinámica de las bacterias oxidantes del amonio y del nitrito en un ciclo productivo de maíz (*Zea mays L*). Memorias, II congreso internacional de agroecología. VI congreso nacional de agroecología. Universidad del Cauca Popayán. Colombia. Octubre 6-8.
65. García, M. 1997. Los abonos verdes una alternativa natural y económica para la Agricultura. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana.
66. García, M.; Treto, E.; Álvarez, M. 2000b. Los abonos verdes: una alternativa para la economía de nitrógeno en el cultivo de la papa. II. Efecto de la interacción abono verde-dosis de nitrógeno. Cultivos tropicales. 21 (1): 13 – 19.
67. García, M.; Treto, E.; Álvarez, M. 2000a. Los abonos verdes: una alternativa para la economía de nitrógeno en el cultivo de la papa. I. Estudio comparativo de diferentes especies. Cultivos tropicales. 21 (1): 5 – 11

68. García, M.; Treto, E.; Álvarez, M. 2002. Época de siembra más adecuada para especies promisorias de abonos verdes en las condiciones de Cuba. *Cultivos tropicales*. 23 (1): 5– 14.
69. Gerdemann, J.W.; Nicholson, T.H.1963. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46: 235-244.
70. Giovannetti, M.; Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489 – 500.
71. Gómez, E. J.; Padilla, R.; López, R.; Zamora, A.; Santiesteban, R. 2009. Efecto de la coinoculación *Rhizobium* – micorriza en frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L.) Var. It 86 d-715, en un suelo fluvisol de la provincia Granma. Resúmenes XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología y I Conferencia Iberoamericana de Interacciones Microorganismo- Planta- Ambiente. La Habana.
72. Gómez, Z. J. 2000. La materia orgánica en los agroecosistemas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 70 p.
73. González, P.; Pérez, G.; Medina, N.; Crespo, G.; Ramírez, J.F.; Arzola, J. 2012. Coinoculación de cepas de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular (*Glomus cubense*) y su efecto en kudzú (*Pueraria phaseoloides*). Nota técnica. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 46 (3) 331-334.
74. Gryndler, M. Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. En: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Dordrecht : Kluwer Academic Press, 2000.
75. 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.
76. Hepper, C.M.; Warner, A. 1993. Role of organic matter in growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81: 155-156.
77. Hernández, I.; Pérez, G.; García, M.; Rosales, P.; Baños, R.; Ramírez, J.F. 2012a. Selección de aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*. 33 (3): 27-33.

78. Hernández, I.; Pérez, G.; García, M.; Rosales, P.; Gordillo, R.; Ramírez, R. 2012b. Caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*. 33(4). 21-28.
79. Herrera, R.A.; Ferrer, R.; Furrázola, E.; Oroozco, M. O. 1995. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas (VA) en un bosque tropical. *Biodiversidad en Ibero América: Ecosistemas, Evolución y Proceso sociales*, (Eds. Maximina Monasterio): Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo. Sub – programa XII, Diversidad Biológica, Mérida. 201p.
80. Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-237.
81. Howeler R, H. 1985. Aspectos prácticos de la investigación de micorrizas vesículo arbusculares demostrados en el cultivo de la yuca. Cali: CIAT. 44 - 61p.
http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_053282.pdf.
82. INSMET. 2010. Hojas de asentamiento de las variables meteorológicas diarias. Estación meteorológica de Jamaiquita. Salvador. Guantánamo. Instituto de Meteorología. CITMA. Cuba.
83. INSMET. 2011. Hojas de asentamiento de las variables meteorológicas diarias. Estación meteorológica del Jobito. Salvador. Guantánamo Instituto de Meteorología. CITMA. Cuba.
84. Jeffries, P.; Gianinazzi, S.; Perotto, S.; Turnau, K.; Barea, J.M. 2003. "The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility." *Biology and Fertility of Soils* 37: 1-16.
85. Jiménez, A. M.; Farfán V. F.; Morales L. C. S. 2005. Masa seca y contenido de nutrientes de *Cajanus cajan*, *Crotalaria juncea* y *Tephrosia candida*, empleadas como abonos verdes en cafetales. *Cenicafé* 56(2):93-109.
86. Jiménez, J. J.; Peña, J. J. 2000. Fijación biológica de N₂ (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.

87. Jonson, N.C.; Pflieger, F.L. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stresses. In: G.J. Bethlenfalvay y R.G. Linderman (eds.) Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA Special Publisher No. 54 Madison, Wisconsin USA. 71-97 p.
88. Kantar, F.; Shivakumer, B. G.; Arrese-Igor. 2010. Climate Change and Management of Cool Season Grain Legume Crops. Efficient Biological Nitrogen Fixation Under Warming Climates. Turkía. Springer. 283-306p.
89. Keng, J. 1996. Legume green manuring. Disponible en: <http://www.agric.gov.ab.ca/agdex/100/2300202.html>. Consultado el 10 de enero del 2013.
90. Kurle, J.E.; Pflieger, F.L. 1994. Arbuscular mycorrhizal fungus spore populations respond to conversions between low-input and conventional management practices in a corn-soybean rotation. *Agronomic J.* 86:467-475.
91. Lavelle, P. 2012. Territorios ecoeficientes para una agricultura rentable, equitativa y sostenible [diapositivas]. Seminario Agroecológico: Ciencia, Encuentros y Saberes 7 Año “Agroecología y Ambiente”. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 35 diapositivas.
92. Lloyd, P. 1997. Green manure crops. Disponible en: <http://www.bury-rd.demon.co.uk/green.htm>. Consultado el 10 de enero de 2013.
93. López, R.; González, L.; Ramírez, R.; Cordoví, E.; Gómez, I.; Castillo, P. 2000. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas pratenses en suelos afectados por la salinidad. *Pastos y forrajes*. 23(2): 129-134.
94. Lozano, Z.; Hernández, R.; Delgado, M. 2011. Cultivos de cobertura y fertilización fosfórica y su efecto sobre algunas propiedades químicas del suelo en un sistema mixto maíz-ganado. *Venesuelos*: 19:45-54.
95. Madero, E.; Gómez, E.; Sánchez de P, M. 2003. Propiedades físicas y químicas, algunas características del suelo a ser tomadas en cuenta en la finca: índice hídrico e índice de protección. Cuadernos ambientales No. 9. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y Ministerio de Agricultura. 3-14 p.
96. Madigan, M.; Martinko, T.; Parker, J. 2004. *Brok, biología de los microorganismos*. Décima edición. Madrid.

97. Marrero, Y. 2010. Efecto de frecuencias de inoculación micorrízica y el laboreo sobre una secuencia de cultivos en un suelo Pardo Mullido Carbonatado. Tesis en opción al Grado de Maestro en ciencias Agrícolas. INCA, La Habana. 78 p.
98. Marschner, H.; Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. In: A.D. Robson, L.K. Abbott y N. Malujezuk (eds.). Management of mycorrhizal in agriculture, horticulture and forestry. Kluwer. Academic Publisher. Netherlands. 89-102 p.
99. Martín, G. M. 2009. Manejo de la inoculación micorrízica arbuscular, *Canavalia ensiformis* y la fertilización nitrogenada en plantas de maíz (*Zea mays*) cultivadas sobre suelos Ferralíticos Rojos de La Habana. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. (INCA). La Habana. 101 p.
100. Martín, G. M.; Arias, L.; Rivera, R. 2010. Selección de las cepas de HMA más efectivas para la *Canavalia ensiformis* cultivada en suelo Ferralítico Rojo. Cultivos Tropicales. 31 (1). 27 – 31.
101. Martín, G. M.; Janaina, R.; Costa, R.; Urquiaga, S.; Rivera, R. 2007. Rotación Del Abono Verde *Canavalia Ensiformis* Con Maíz Y Micorrizas Arbusculares En Un Suelo Nitisol Ródico Éútrico De Cuba. Agronomía Trop. 57(4): 313-321.
102. Martín, G. M.; Rivera, R.; Pérez, A.; Arias, L. 2012. Respuesta de la *Canavalia ensiformis* a la inoculación micorrízica con *Glomus cubense* (cepa INCAM-4), su efecto de permanencia en el cultivo del maíz. Cultivos Tropicales.33(2): 20-28
103. Martínez- Viera, R.; Dibut, A. B. 2012. Biofertilizantes bacterianos. Editorial científico tecnica, La Habana, Cuba. 279 p.
104. 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.
105. Mayea, S. S.; Novo, R. S.; Valiño, A. A. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Pueblo y Educación. 2da edición. 1991.
106. Mayz, J. 1997. Simbiosis Leguminosas/Rizobia. Ediciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias IIAPUDO. Universidad de Oriente. Núcleo de Monagas. Maturín. Venezuela. 113 p.
107. Mayz, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. Revista UDO Agrícola 4 (1): 1-20.

108. Mayz-Figueroa, J. 2007. *Cajanus cajan* L. Fijación biológica de nitrógeno (FBN) en un suelo de sabana. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 24(1): 312-317.
109. Miller, M. H.; Mcgonigle, T. P.; Addy, H. D. 1995. Functional Ecology of Vesicular Arbuscular Mycorrhizas as Influenced by Phosphate Fertilization and Tillage in an Agricultural Ecosystem. *Critical Reviews in Biotechnology* 15 (3-4): 241 – 255.
110. Miller, R.M.; Jastrow, J.D. 1994. The application of VA mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In. M.F. Allen (ed.) *Mycorrhizal functioning, an integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall, New York. 534 p.
111. MINAG. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana. Agrinfor. 64 p.
112. Mosavi, SB.; Jafarzadeh, AA.; Nishabouri, MR.; Ostan, SH.; Feiziasl, V. 2009. Application of Rye green manure in Wheat rotation system alters soil water content and chemical characteristics under dryland condition in Maragheh. *Pakistan Journal of biological Science* 12 (2): 178-182.
113. Muñoz, E.; Macías, C.; Ramírez, A.F.; Sánchez-Chávez, E.; Jiménez-Castro, J.; González-García, J. 2009. Identificación y colonización natural de hongos micorrízicos arbusculares en nogal. *Terra Latinoamericana* 27(4): 355-361.
114. Netto, D.V. 2008. Apuntes de clase - Facultad de Agronomía. U.B.A. Biología. Las plantas y los minerales. Disponible en: http://www.fisicanet.com.ar/biologia/fisiologia/ap01_absorcion_de_minerales.php. Consultado en Septiembre de 2013.
115. Ohtomo, R.; Saito, M. 2005. Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 167: 571–578.
116. Olivares, V. J. 2006: Fijación biológica del nitrógeno. Disponible en: <http://www.eez.csic.es-olivares/ciencia/fijacion>. Consultado abril de 2013.
117. Olsson, P.A.; Ingrid, M.; William, G.; Allaway, A.E.; Rouhier, H. 2002. Phosphorus Effects on Metabolic Processes in Monoxenic Arbuscular Mycorrhiza Cultures. *Plant Physiology* 130: 1162-1171.
118. Oomah, B.; Bushuk, W. 1983. Characterization of lupine proteins. *J Food Sci* 48(1):38 41.

119. Paneque, V.M.; Calaña, J. M.; Calderón, M.; Borges, Y.; Hernández, T.; Caruncho, M. 2010. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Ediciones INCA, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, 160 p.
120. 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.
121. Peoples, M. 2004. Nitrogen dynamics in legume-based pasture systems. In SCOPE 65: Agriculture and the Nitrogen Cycle: Assessing the Impacts of Fertilizer Use on Food Production and the Environment, edited by A.R. Mosier, J.K. Syers and J.R. Freney. Island Press, Washington, DC, USA.
122. Pérez, G.; Gómez, G.; Nápoles, M.; Morales, B. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. Pastos y Forrajes. 31(2): 151-159.
123. Pérez-Luna, Y.; Álvarez-Solís, J.D.; Vegas, J.; Fernández, J.M.; Gómez- Álvarez, R.; Cuevas, L. 2012. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en maíz con cultivo de cobertura y biofertilizantes en Chiapas, México. Gayana Bot. 69 (1): 46-56 p.
124. Perin, A.; Santos, R.H.S.; Urquiaga, S.; Guerra, J.G.M.; Cecon, P.R. 2004. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. Pesq. Agropec. bras. 39 (1): 35 – 40.
125. Phillips, D.M.; Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55. 158-161.
126. Piamonte, R. 1993. Contribución al desarrollo de nuevos métodos para abono verde. Agricultura Biológica, Alimentación y Salud. Bogotá.
127. Prager, M.; Sanclemente, E.; Sánchez de P, M.; Gallego, J.; Angel- Sánchez, D. 2012. Abonos verdes: Tecnología para el manejo agroecológico de los cultivos. Agroecología. 7 (1): 53-62.

128. Prager, M.; Victoria, J.A.; Sánchez de P, M. 2002. El suelo y los Abonos Verdes, una alternativa de manejo ecológico. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y Ministerio de Agricultura. Cuadernos ambientales. 7: 4-16.
129. Puertas, F.; Arévalo, E.; Zúñiga, L.; Alegre, J.; Loli, O.; Soplin, H. 2008. Establishment of cover crops and their growth and nutrient uptake in a humid tropical soil of the peruvian amazon. *Ecología Aplicada*. 7(1,2): 7.
130. Ramírez, J.G.; Osorno, L.; Osorio, N.W.; Morales, J.G. 2013. Alternativas Microbiológicas para mejorar el crecimiento del Caupí. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 66(2): 7035-7044.
131. Ramírez, P. 2011. Comportamiento de tres abonos verdes y su efecto en el rendimiento de Maíz. *Agronomía Tropical*. 37(1): 3-17.
132. Randhawa, P.; Condrón, L.; Di, H.; Sinaj, S.; Mclenaghen, R. 2005. Effect of green manure addition on soil organic phosphorus mineralization. *EN: Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 73: 178-189.
133. Read, DJ. 1998. Mycorrhiza-the state of the art. In: Varma A, B Hock. *Mycorrhiza* Springer-Verlag. Berlin. 3-36 p.
134. Requena, N. 2005. Measuring quality of service: phosphate 'a la carte' by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 18(2): 268-271.
135. Reyes, R. 2013. Efecto de la coinoculación de cuatro cepas de *Rhizobium* y dos de HMA sobre *Canavalia ensiformis* crecida en dos suelos cubanos. Tesis presentada en opción al grado de Ingeniero Agrónomo. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana. 36 p.
136. Reyes-Jaramillo, I. 2002. Asociaciones biológicas en el suelo: la micorriza arbúscular. *Contactos*. 44:5-10.
137. 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.
138. Rivera, R.; Fernández, F.; Fernández, K.; Ruiz, L.; Sánchez, C.; Riera, M. 2007. Advances in the management of effective arbuscular mycorrhizal symbiosis in tropical ecosystems. Pages 151-196 In: *Mycorrhizae in Crop Production* (eds.)

- Chantal Hamel and Christian Plenchette. Haworth Press, Binghamton, 67NY. Hard Cover ISBN: 978-1-56022-306-1; Soft Cover ISBN: 978-1-56022-307-8.
139. Rivera, R.; Fernández, K. 2003. Manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: el Caribe. Eds. INCA. La Habana., 166p.
140. Rivera, R.; Ruiz, L.; Fernández, F.; Sánchez, C.; Riera, M.; Hernández, A.; Fernández, A.; Fernández, K.; Planas, R. 2006. La simbiosis micorrízica efectiva y el sistema suelo – planta – fertilizante. En: VI Congreso Sociedad Cubana de la Ciencia del Suelo (16: 2006 mar, 8 – 10: La Habana). Memorias. CD – ROM. Sociedad Cubana de la Ciencia del Suelo.
141. Rivera, R.; Sánchez, C.; Caballero, D., Cupull, R.; González, C.; Urquiaga, S. 2010. Abonos verdes e inoculación micorrízica de posturas de cafeto sobre Suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados. Cultivos Tropicales. 31 (3): 75-81.
142. Rodríguez, Y.; Dalpé, Y.; Séguin, S.; Fernández, F.; Fernández, F.; Rivera, R. 2011. *Glomus cubense* sp nov., an arbuscular mycorrhizal fungus from Cuba. MYCOTAXON. 118, October–December. 337–347p.
143. Ruíz, L. 2001. Efectividad de las asociaciones micorrízicas en especies vegetales de raíces y tubérculos en suelos Pardos y Ferralíticos Rojos de la región central de Cuba. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA, La Habana. 100 p.
144. Ruiz, L.; Simó, J.; Rivera, R.; Carvajal, D.; García, O.; Pérez, J. 2009. Respuesta de la Canavalia a la inoculación conjunta de cepas de *Rizobium* y HMA sobre suelos Pardos con Carbonatos. Presentaciones. Taller Nacional de la Red Temática de Simbiosis Micorrízica 25 al 27 de noviembre de 2009. Memorias. CD – ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
145. Sánchez de P. M. 2003. Actividad biológica en la rizosfera del maracuyá-*Pasiflora edulis* var. Flavicarpa en diferentes sistemas de manejo, estados de desarrollo y condiciones fitosanitarias. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid. 261 p.

146. Sánchez de P. M.; Gómez, E.; Muñoz, J. E.; Barrios, E.; Prager, M.; Bravo, O. 2007. Las endomicorrizas, expresión bioedáfica de importancia en el trópico. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Editorial Feriva. 351 p.
147. Sánchez, C. 2001. Manejo de las asociaciones micorrízicas arbusculares y abonos verdes en la producción de posturas de cafeto en algunos tipos de suelo. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana.
148. Sánchez, C.; Caballero, D.; Cupull, R.; Gonzáles, C.; Urquiga, S.; Rivera, R. 2009. Los abonos verdes y la inoculación micorrízica de plántulas de *Coffea arabica* Sobre suelos Cambisoles Gléyicos. Cultivos Tropicales. 30 (1): 25 - 30.
149. Sánchez, C.; Rivera, R.; Bustamantes, C.; Pérez, C.; Cupull, R.; González, C.; Ferrer, M. 2003. Efecto de diferentes fuentes de abonos verdes sobre el desarrollo de las posturas de cafetos en un suelo pardo gleyoso. Primera parte. Centro Agrícola. 29 (3) 4:72-76.
150. Sánchez, C.; Rivera, R.; Caballero, D.; Cupull, R.; González, C.; Urquiaga, S. 2011. Abonos verdes e inoculación micorrízica de posturas de cafeto sobre suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados. Cultivos Tropicales. 32 (3): 11-17.
151. Sanclemente, R. O.; Prager, M.; Sánchez de P.M. 2011. Los cultivos de cobertura: un aporte valioso de materia orgánica a suelos degradados y de baja fertilidad. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 16 p.
152. Schüßler, A. & Walker, C. 2011. Evolution of the „Plant-Symbiotic“ Fungal Phylum, Glomeromycota. Evolution of fungi and fungal-like organisms, The Mycota XIV. Pöggeler, S. & Wöstemeyer, J. (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 163-185.
153. Shoko, M. 2009. Exploring phosphorus, *Mucuna (Mucuna pruriens)* and nitrogen management options for sustainable maize production in a depleted kaolinitic sandy loam soil of Zimbabwe. Dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Agriculture, At Stellenbosch University. Chapter 3: 26-40.

154. Sieverding, E. 1991. Vesicular- Arbuscular Mycorrhizae Management In Tropical Agrosystem. Technical Cooperation, Federal Republic Germany. Eschborn, Alemania.
155. Simó, J.; Ruiz, L.; Rivera, R.; Carvajal, D.; Morales, O. 2009. Contribución micorrízica en los sistemas integrados de nutrición y fertilización de bananos en Cuba. Presentaciones. Taller Nacional de la Red Temática de Simbiosis Micorrízica 25 al 27 de noviembre de 2009. Memorias. CD – ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
156. Siqueira, J.O.; Franco, A.A. 1988. Biotecnología do solo. Fundamento e perspectivas. Brasilia: MEC – Ministerio de Educação, ABEAS; Larras: ESAL, FAEPE. 236 p.
157. Siqueira, J.O.; Franco, A.A. 1988. Biotecnología do solo. Fundamento e perspectivas. Brasilia: MEC – Ministerio de Educação, ABEAS; Larras: ESAL, FAEPE. 236 p.
158. Smith, S.; Read, D. 2008. Mycorrhizal Symbiosis, Elsevier Edition. Third Edition. 10-90.
159. Sociedad de agricultores de Chile. 2013. Boletín de Agricultura y abonos verdes. Disponible en: http://www.abcagro.com/fertilizantes/abonos_verdes.asp. Consultado en marzo de 2013.
160. Souza, L.; Bezerra, N.; Santos, E.; Silva, R.; Stamford, N. P. 2007. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. *Pesq. agropec. bras.* 42 (2): 207-217 p.
161. Takanishi, I.; Ohtomo, R.; Hayatsu, M.; Saito, M. 2009. Short-chain polyphosphate in arbuscular mycorrhizal roots colonized by *Glomus* spp.: A possible phosphate pool for host plants. *Soil Biology & Biochemistry* 30 (3): 42.
162. Tejada M.; González, J.L.; García, A.; Parrado, J. 2007. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *Journal Bioresource Technology*. 99: 1758- 1767.
163. Thomson, B.D.; Robson, A.D.; Abbott, L.K. 1991. Soil mediated effects of phosphorus supply on the formation of mycorrhizas by *Scutellispora calospora* (Nicol. y Gerd.). Walker y Sanders on subterranean clover. *New Phytol.* 118: 463-469.

164. Torres, D.; del Pino, A.; Casanova, O.; Arrondo, F. 1995. Abonos verdes para maíz. Diálogo XLIII Maíz: Sistemas de producción. Programa cooperativo para el desarrollo tecnológico agropecuario del Cono Sur. PROOCISUR. IICA. Montevideo, Uruguay. 188p.
165. Trannin, W.S.; Urquiaga, S.; Guerra, G.; Ibjibjen, J.; Cadisch, G. 2000. Interspecies competition and N transfer in a tropical grass – legume mixture. *Biol. Fertil. Soils.* 32: 441 – 448.
166. Treto, E.; García, M.; Martínez, R.; Febles, J.M. 2001. Avances en el manejo de los suelos y la nutrición orgánica: 167 – 190. En: Transformando el campo cubano. Avances de la agricultura sostenible. Eds: Funes, F.; García, L.; Bourque, M.; Pérez, N.; Rosset, P. ACTAF, La Habana, Cuba. 286 p.
167. Trimble, M.R.; Knowles, N.R. 1995. Influence of phosphorus nutrition and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on growth and yield of greenhouse cucumber (*Cucumis sativus L.*) *Can. J. Plant Science.* 75: 251-259.
168. 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.
169. Ulrike, B. 1997. Manual de Leguminosas de Nicaragua. Pasolac, E.A.G.E. Estelí. Nicaragua. 528 páginas.
170. Urquiaga, S.; Zapata, F. 2000. Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe. Porto Alegre: Génesis: Río de Janeiro: Embrapa, Agrobiología. 110 p.
171. USDA. 1996. Cover and green manure crop benefits to soil quality technical. Note No.1 (Abril). Disponible en:
172. Vásquez, E.R. 2011. Contribución al tratamiento estadístico de datos con distribución binomial en el modelo de análisis de varianza. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Mayabeque, INCA, 97 p.

173. Vázquez, L.; Álvarez, J. 2011. Control ecológico de poblaciones de plagas. Instituto de investigaciones de sanidad vegetal, Ministerio de la Agricultura. Editorial CIDISAV. La Habana, Cuba. 134 p.
174. Vélez, F. 2012. Efecto de abonos verdes en la agregación y micorrización en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en un suelo de ladera de Palmira (COLOMBIA). Tesis en opción al Grado de Maestro en ciencias Agrarias. Universidad nacional de Colombia. 96 p.
175. 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 NO₃⁻ as nitrogen source." *Can. J Bot.* 80: 571-576.
176. Wang, G.M.; Stribley, D.P.; Tinker, P.B.; Walker, C. 1993. Effects of pH on arbuscular mycorrhizae. Field observations on the long-term liming experiments at rothamsted and woburn. *New Phytol.* 124 : 465-472.
177. Yagodín, B. A. 1986. Agroquímica. Moscú: Editorial Mir. T 1.
178. Zea, J. L. 1993. Efecto residual de intercalar leguminosas sobre el rendimiento de maíz en nueve localidades de Centroamérica. *Rev. Agronómica Mesoamericana*, 4:18-22.
179. Zea, J. L.; Barreto, H.; Sain, G. 1992. Efecto de intercalar leguminosas a diferentes dosis de fósforo sobre el rendimiento de maíz, (*Zea mays* L), en 24 ensayos a través de Centroamérica. En *Análisis de los Ensayos Regionales de Agronomía de 1990*, CIMMYT. Guatemala. 27-42 p.