

SELECCIÓN DE CEPAS EFICIENTES DE *Rhizobium* Y MICORRIZAS EN *Canavalia ensiformis* (L.) D.C.

[SELECTION OF EFFICIENT STRAINS OF *Rhizobium* AND MYCORRHIZES IN *Canavalia ensiformis* (L.) D.C.]

Yonger Tamayo-Aguilar^{1§}, Gloria M. Martín-Alonso³, Ernesto Castañeda-Hidalgo², Carlos Anselmo-Sánchez¹, Leudiyanes Ramos-Hernández, Gisela Margarita Santiago-Martínez²; Yuris Rodríguez-Matos¹

¹Departamento de Agronomía. Facultad Agroforestal. Universidad de Guantánamo. Av. Che Guevara, km 1.5, carretera Jamaica, 95100, Guantánamo, Cuba. ²Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex-hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca, México. C.P. 71230. Tel. 9515170788. ³Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32700. Autor para correspondencia: (yongertamayo@gmail.com).

RESUMEN

Las leguminosas son una alternativa sostenible para incorporar nitrógeno a los sistemas agrícolas, dada su capacidad de actuar en simbiosis con microorganismos para la fijación biológica del nitrógeno (FBN). El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la respuesta de *Canavalia ensiformis* coinoculada con micorrizas y *Rhizobium*. El experimento se estableció en Guantánamo, Cuba; en dos ciclos, marzo-junio de 2015 y noviembre-enero de 2016; en un suelo Pardo Sialítico Cálcico Carbonatado. El diseño experimental fue en bloques al azar con arreglo bifactorial. Se estudió el efecto de la coinoculación de las cepas de *Rhizobium* Can 2, Can 3, Can 4 y Can 5 con un título de 1×10^8 UFC g⁻¹, y su combinación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) *Rhizoglyphus irregularis* y *Glomus cubense* de calidad mínima garantizada, 20 esporas g⁻¹ de inoculante; para la selección de las mejores cepas de *Rhizobium* y de HMA en indicadores del crecimiento y desarrollo de *C. ensiformis*. Las variables evaluadas fueron: número de esporas, colonización micorrízica, densidad visual y producción de nódulos. La mejor combinación se dio con la cepa de *Rhizobium* Can 5 y el HMA *R. irregularis*, con los que se logró incrementar significativamente los parámetros evaluados.

Palabras clave: colonización micorrízica, fijación de nitrógeno, hongos micorrízicos arbusculares, rizobios.

ABSTRACT

Legumes are a sustainable alternative to incorporate nitrogen into agricultural systems, given their ability to act in symbiosis with microorganisms for the biological fixation of nitrogen (BNF). The present work aimed to evaluate the response of *Canavalia ensiformis* coinoculated with mycorrhizae and *Rhizobium*. The experiment was established in Guantánamo, Cuba; in two cycles, march-june 2015 and november-january 2016; on a Brown Sialitic Calcic Carbonated soil. The experimental design was in randomized blocks with a bifactorial arrangement. The effect of coinoculation of the *Rhizobium* strains Can 2, Can 3, Can 4 and Can 5 with a titer of 1×10^8 CFU g⁻¹, and their combination with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Rhizoglyphus irregularis* and *Glomus cubense* were studied of guaranteed minimum quality, 20 spores g⁻¹ of inoculant; for the selection of the best strains of *Rhizobium* and AMF in indicators of growth and development of *C. ensiformis*. The variables evaluated were: number of spores, mycorrhizal colonization, visual density and nodule production. The best combination was with the *Rhizobium* Can 5 strain and the HMA *R. irregularis*, with which it was possible to significantly increase the evaluated parameters.

Key words: mycorrhizal colonization, nitrogen fixation, arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia.

INTRODUCCIÓN

La aplicación continua de fertilizantes químicos ha propiciado desbalances en el biotopo, por lo que se considera una actividad agrícola poco sostenible para la producción; además, en Cuba los fertilizantes son importados, lo que encarece el proceso, son poco accesibles y aplicados de forma inapropiada pueden contaminar el agua y el medio ambiente. Es una realidad que la mayoría de los suelos agrícolas presentan déficit de materiales orgánicos. Lo que provoca condiciones desfavorables para la nutrición de los cultivos y hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de fertilización, en especial, en los principales elementos en la nutrición de los cultivos, nitrógeno y fósforo (Martín, 2009; Tamayo-Aguilar *et al.*, 2020). La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es un fenómeno de importancia en la naturaleza, pues representa la utilización de un gas inerte como fuente nutrimental para un grupo de microorganismos. Este elemento fijado en el suelo puede ser utilizado directa o indirectamente por plantas mediante las relaciones simbióticas con los microorganismos diazotróficos, constituyendo el mecanismo de compensación de las pérdidas del elemento en forma gaseosa por las acciones microbianas de nitrificación, desnitrificación y volatilización del amoníaco (Cerón y Aristizábal, 2012; Martín *et al.*, 2017).

Una forma sostenible de incorporar N_2 a los sistemas agrícolas es la inserción de plantas que establezcan simbiosis capaces de realizar la fijación biológica de nitrógeno dentro de las rotaciones de los cultivos. Entre estos tipos de planta se encuentran las leguminosas que se emplean como abonos verdes, las cuales son capaces de mantener o mejorar las características físicas, químicas y biológicas del suelo, importante en el ahorro de fertilizantes nitrogenados y la reducción de costos de producción (Martínez *et al.*, 2007; García-Rubido *et al.*, 2017; Martín *et al.*, 2017a, b).

La *Canavalia ensiformis*, conocida localmente como frijol de machete o frijol de bibijagua es una leguminosa que prospera bajo condiciones de sequía y generalmente se utiliza como abono verde en distintos sistemas de cultivo, especialmente maíz y café. Su rápida descomposición de su biomasa vegetal y aportes de reciclajes de nutrimentos influyen en la nutrición nitrogenada de cultivos sucesivos (García-Rubido *et al.*, 2017). En las condiciones de Cuba, *C. ensiformis* ha sido capaz de aportar más de 150 kg N ha⁻¹ y hasta 5 t ha⁻¹ de masa seca, además de elevar sosteniblemente los rendimientos de diversos cultivos como maíz, papa, calabaza, yuca, malanga, etc. (García *et al.*, 2002; Tamayo *et al.*, 2015; Rivera *et al.*, 2020). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), unidos con los rizobios son vías que permiten mejorar el desarrollo de los cultivos cuando interactúan con las plantas creando simbiosis entre sí, los cuales están presentes en cerca del 80% de los cultivos agrícolas y pueden aumentar los procesos de absorción y traslocación de nutrientes en las plantas a través de la micorrización efectiva y de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Hernández *et al.*, 2002; Tamayo *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2017a).

En la coinoculación tripartita HMA-*Rhizobium*-leguminosas, se ha reportado que las relaciones simbióticas proporcionan un mayor intercambio entre los simbioses y efectos superiores a las plantas, y en particular existen reportes de incremento en la producción de biomasa de *C. ensiformis* y de su contribución al mejoramiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (García-Rubido *et al.*, 2017; Joao *et al.*, 2017; Simó *et al.*, 2020; Padrón-Rodríguez *et al.*, 2020). En este caso, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas aporta N_2 y las micorrizas incrementan la absorción de otros elementos, entre ellos el P, muy importante para garantizar una adecuada fijación biológica de nitrógeno y crecimiento de la planta (Martín *et al.*, 2017; Wilches-Ortiz *et al.*, 2019; Tamayo-Aguilar *et al.*, 2020). La doble inoculación *Rhizobium*-HMA produce mayor crecimiento, número, peso seco en los nódulos y mayores contenidos de P y N en la planta (Martín, 2009; Tamayo *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2017a). A partir de las consideraciones anteriores, se evaluaron cuatro cepas de *Rhizobium* en combinación con dos HMA, *Glomus cubense* y *Rhizoglomus irregulare*, en algunos indicadores del crecimiento y desarrollo de *C. ensiformis* para la selección de las mejores cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estableció un experimento de campo sobre un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado (Hernández *et al.*, 2015), en dos ciclos diferentes (primavera e invierno), marzo-junio de 2015 y noviembre-enero de 2016, en las instalaciones de la Facultad Agroforestal de Montaña, municipio El Salvador, Guantánamo, Cuba. Las características químicas de importancia del suelo fueron: pH neutro (6.9), contenido medio de materia orgánica (MO) (3.4%), alto contenido de fósforo (P), como consecuencia de las abundantes fertilizaciones minerales en anteriores experimentos en caña de azúcar, y valores normales de potasio (K) ($0.61 \text{ cmol kg}^{-1}$), calcio (Ca) ($40.0 \text{ cmol kg}^{-1}$), magnesio (Mg) ($12.5 \text{ cmol kg}^{-1}$) y sodio (Na) ($0.56 \text{ cmol kg}^{-1}$), típicos para estos suelos.

Métodos de inoculación de los biofertilizantes empleados

Como inóculo micorrízico se utilizó el producto comercial *Ecomic*® a base de dos especies: *Glomus cubense* (INCAM- 4) y *Rhizoglossum irregulare* (INCAM-11 DAOM), de calidad mínima garantizada de 40 esporas g^{-1} de inoculante, producto no tóxico y libre de patógenos, producido por primera vez en 1999 por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) La Habana, Cuba. Recomendada como cepa eficiente para estas condiciones edáficas y generalista con las especies vegetales dependientes de la micorrización (Rivera *et al.*, 2020), y formulada como polvo fino de acuerdo con Fernández *et al.*, (2000). También fueron utilizadas cuatro cepas de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4 y Can 5) obtenidas por Hernández *et al.* (2012) en concentración de $1 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ como inoculante bacteriano para *C. ensiformis*, pertenecientes a la colección de cepas de rizobios del Laboratorio de Microbiología del INCA. La coinoculación de estos biofertilizantes se aplicó en la siembra mediante el recubrimiento de las semillas (Martin *et al.*, 2010), utilizando una dosis de 5.95 kg ha^{-1} de ambas cepas de HMA y 100 g/cepa , en el caso del inoculante bacteriano. Las semillas se mojaron primeramente con agua azucarada y posteriormente se les aplicó cada cepa de *Rhizobium*, después se procedió a la inoculación con los HMA mediante una mezcla homogénea, se secaron a la sombra durante 15 min y posteriormente se sembró.

Diseño experimental y análisis estadístico

En ambos ciclos se estudiaron cinco niveles del factor inoculación de *Rhizobium* (cuatro cepas 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. Para su distribución se utilizó un diseño de bloques al azar con arreglo bifactorial y cuatro repeticiones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Factores y sus niveles en estudio.

Cepa de <i>Rhizobium</i> *	Inoculación con HMA		Sin inoculación con HMA
	<i>G. cubense</i>	<i>R. irregulare</i>	
Can 2	+	+	-
Can 3	+	+	-
Can 4	+	+	-
Can 5	+	+	-
Testigo sin inoculación de <i>Rhizobium</i>	+	+	-

* Cepas de *Rhizobium* procedentes del Departamento de Fisiología del INCA.

Para cada experimento se utilizó un área de 0.11 ha distribuidas en 60 parcelas. Cada parcela experimental contó de cuatro surcos a una distancia de 0.70 m de camellón por 4 m de largo, para un área de 11.2 m^2 . La *C. ensiformis* se sembró de forma manual, utilizando dos semillas por mata con un arreglo de plantación de $0.70 \times 0.30 \text{ m}$. El manejo se realizó acorde a lo recomendado por Martín (2009). A los 70 días después de la siembra (dds) y en el inicio de la floración se seleccionaron en el área de cálculo (surcos

centrales) tres plantas por metro lineal por cada tratamiento y réplica, dejando los dos primeros surcos como área de borde. Para el análisis de las variables del experimento se utilizó el modelo matemático correspondiente al diseño experimental empleado, comprobándose la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza. Para la determinación de las diferencias entre los tratamientos se utilizó la dócima de comparación de rangos múltiples de Duncan para $p \leq 0.05$. Con el paquete estadístico *Statgraphics Plus* versión 5.1 en ambiente *Windows*.

Evaluaciones realizadas y metodologías empleadas

Presencia de esporas de HMA

La presencia de esporas se realizó mediante su conteo en muestras de 50 g de suelo, 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 muestras fueron tomadas de las plantas correspondiente a un metro lineal en cada parcela a los 70 días después de germinadas. 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).

Frecuencia de colonización radical y densidad visual

Para determinar la frecuencia de colonización radical, se motearon las raíces de las plantas de 1 m lineal a una profundidad de 30 cm en cada parcela a los 70 días después de germinadas. 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 de Phillips y Hayman (1970). La evaluación se realizó por el método de los interceptos de Giovanetti y Mosse (1980), mediante el cual se determinó el porcentaje de colonización micorrízica o frecuencia de colonización. Para la determinación del Porcentaje de Densidad Visual (% DV) se utilizó la metodología de Trouvelot (1986), mediante la cual se evaluó la ocupación fúngica de cada intercepto y se le asignó un nivel (Cuadro 2).

Cuadro 2. Transformación de los porcentajes de ocupación fúngica intrarradical en niveles según Trouvelot (1986).

Evaluación (Niveles)	Ocupación observada (Porcentaje)
0	0
1	1
2	2.5
3	15.5
4	35.5
5	47.5

Posteriormente se realizó el cálculo según la fórmula:

$$\% \text{ DV} = \sum A / \sum Z$$

Donde:

Z = Número de interceptos contados en cada nivel

A = Resultado de la multiplicación del número de interceptos contados en cada nivel (Z), por el porcentaje de ocupación observada.

Producción de nódulos

Se evaluó mediante la medición de las siguientes variables: 1. Nódulos totales: se procedió al conteo visual de la cantidad de nódulos presentes en la raíz de la planta. 2. Nódulos efectivos: a través del conteo visual se determinó la cantidad de nódulos efectivos seleccionando los de color rojo, rosado y marrón presentes en las raíces de la planta. 3. Masa de los nódulos: se determinó a través de una balanza *Sartorius* digital *METTLER*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la coinoculación HMA–*Rhizobium* sobre el número de esporas de HMA por *C. ensiformis* en dos ciclos (primavera e invierno) a los 70 días después de germinada (ddg)

En la figura 1 se muestra el efecto de la coinoculación HMA-*Rhizobium* en el número de esporas por la *C. ensiformis* en cada ciclo a los 70 días después de germinada, además de la interacción entre las cepas de *Rhizobium* y de los hongos micorrícicos arbusculares.

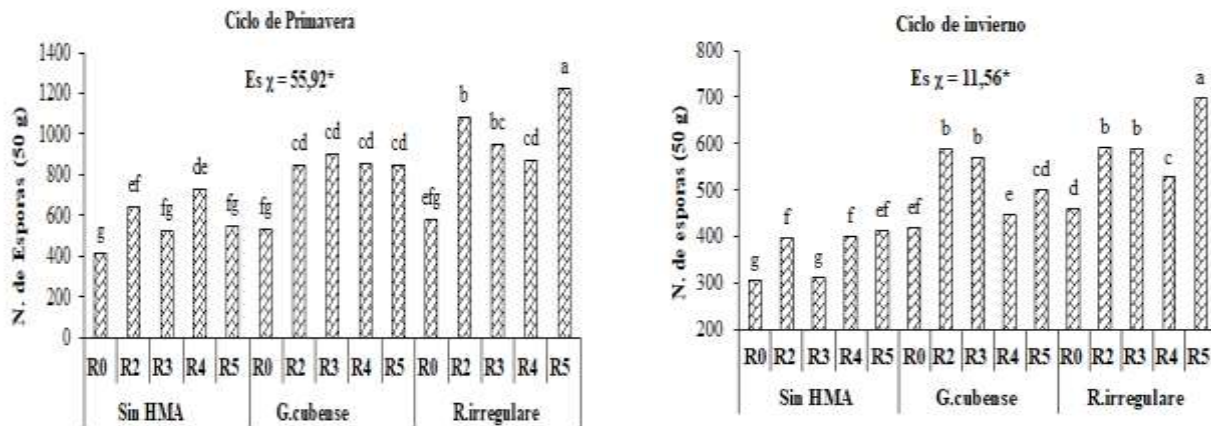


Figura 1. Efecto de la coinoculación HMA–*Rhizobium* en el número de esporas presentes en el suelo. R0: sin cepas de *Rhizobium*, R2, R3, R4 y R5: cepas de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4, Can 5). *G. cubense*: *Glomus cubense*. *R. irregulare*: *Rhizoglomus irregulare*. *Medias con letras distintas difieren entre sí, según prueba de Duncan ($p < 0.05$).

Para los dos experimentos, la cepa *R. irregulare* mostró diferencias ($p \leq 0.05$) con un incremento superior en número de esporas combinada con la cepa Can 5 de *Rhizobium* en relación a la cepa *G. cubense* con Can 5. Sin embargo, cuando *G. cubense* es combinada con Can 2 y Can 3 no existe diferencia significativa en relación a Can 5 para el período de invierno. En el ciclo de primavera, *R. irregulare* alcanzó 1,227 esporas, superior para las dos cepas de HMA en la campaña de invierno; *G. cubense* no arrojó diferencia significativa cuando se combinó con las cepas de *Rhizobium*. Situación que pudo estar dada por la absorción de rápido crecimiento de raíces blancas que se observaron a la hora del muestreo y que estas contienen pocos azúcares disponibles, por lo tanto, estas raíces son mucho menos susceptibles a la colonización micorrízica. Por otra parte, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad no son favorables, no se forma la simbiosis micorrízica, debido a que las esporas de resistencia en el suelo no germinan y para que ocurra la asociación mutualista entre el hongo y las raíces de las plantas, es necesario que las condiciones medioambientales sean favorables para ambos (Rabie *et al.*, 2005).

Al respecto, las micorrizas pudieron influir en la captación de nutrientes poco móviles desde el suelo (Azcón *et al.*, 1991) y los *Rhizobium* en las asociaciones simbióticas con las raíces de *C. ensiformis*, que

favorecen la formación de nódulos efectivos en el rizoplasma de las plantas (Helyar, 2003; Hernández *et al.*, 2012). Al respecto, se han reportado beneficios al inocular *C. ensiformis* con rizobio y cepas eficientes de HMA (García *et al.*, 2017; Martín *et al.*, 2017b; Simó *et al.*, 2019; 2020). También, se ha encontrado incrementos significativos de la colonización micorrízica de *C. ensiformis* coinoculadas con cepas Can 2, Can 3, Can 4, Can 5 de rizobios y de *Glomus intraradices* en suelos pardos con carbonatos, y para estos efectos se obtuvo que Can 5 y *G. intraradices* superó al resto de las cepas de rizobios y de HMA, lo que permitió considerarlas como cepas eficientes para *C. ensiformis* en las condiciones edáficas estudiadas (Bustamante *et al.*, 2009; Bustamante *et al.*, 2010; Tamayo *et al.*, 2015). En relación a lo anterior, *C. ensiformis* ha demostrado su efectividad simbiótica con inoculaciones de cepas de rizobios y de HMA en diferentes tipos de suelo en las condiciones de Cuba. Así mismo, se ha expresado que la efectividad alcanzada por la inoculación de las mejores cepas para cada suelo depende del manejo que se le aplique al cultivo, la cepa de HMA empleada y el suelo (Martín *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2017b).

Por otra parte, estudios en el cultivo de Café con el empleo de *C. ensiformis* coinoculada con rizobios y HMA tanto en asociación como precedente, han indicado incrementos significativos en el número de esporas de HMA, así como un óptimo de crecimiento y funcionamiento micorrízico en el cultivo (Rivera, 2010; Sánchez *et al.*, 2011).

Efecto de la coinoculación HMA–*Rhizobium* sobre la frecuencia de colonización micorrízica y la densidad visual por *C. ensiformis* en diferentes ciclos (primavera e invierno) a los 70 días después de la germinación (ddg)

Durante los dos ciclos se observó diferencias ($p \leq 0.05$), *R. irregulare* + Can 5, mostraron los mejores resultados de colonización micorrízica con un valor de 81.73 y 9.47% de densidad visual en el período de primavera, de igual manera 77.67 y 9.26% en el período de invierno, con respecto a los demás tratamientos (Cuadro 3). En el caso de *G. cubense* inoculada con Can 3, el efecto de la colonización y la densidad visual fue superior en relación a las demás cepas de rizobios para el ciclo de invierno. Sin embargo, en la primavera, el porcentaje de colonización y la densidad visual fue mayor con Can 5, situación similar ocurrió con *R. irregulare*, pero con valores superiores, demostrando que las condiciones edafoclimáticas del área fueron propicias para la efectividad de la colonización micorrízica. Estos resultados demuestran la eficiencia y la efectividad de la inoculación de la cepa *R. irregulare* en relación con el porcentaje de colonización micorrízica y densidad visual en *C. ensiformis* para este suelo, lo que corrobora lo planteado por Ruiz (2001); Rivera y Fernández (2003); Rivera *et al.* (2007) Tamayo *et al.* (2015) y Rivera *et al.* (2020), los cuales refieren que *R. irregulare* es la cepa más efectiva y eficiente para la inoculación micorrízica de los cultivos en suelos Pardos con Carbonatos, basado en la baja especificidad cepa eficiente HMA–cultivo; lo que significa que establece una simbiosis efectiva con cualquier cultivo dependiente de la micorrización que se forme en ese suelo en condiciones edáficas.

Díaz y Garza (2007) demostraron que la inoculación con *G. intraradices* impactó favorablemente el crecimiento del sorgo en suelo con baja fertilidad logrando un alto porcentaje de colonización e intensidad visual, por el grado de especificidad entre el HMA y el cultivo evaluado, además del crecimiento externo del micelio como a la extensión de la superficie de exploración y a la capacidad del HMA para incrementar el transporte de nutrimentos, particularmente fósforo.

Por su parte, Vélez (2012), refiere que el aumento del porcentaje de colonización micorrízica puede estar ocasionado por las acciones que ejercen los HMA en el incremento y la absorción de nutrientes disponibles para las plantas. Al respecto, Avio *et al.* (2018) y Martino *et al.* (2019) señalan que los hongos micorrícicos arbusculares establecen simbiosis con las raíces de la mayoría de las plantas terrestres por medio de una gran red extrarradical de hifas que favorece la absorción de nutrimentos minerales y compuestos orgánicos en comparación con aquellas no micorrizadas.

Cuadro 3. Efecto de la coinoculación de HMA y *Rhizobium* en la colonización micorrízica y la densidad visual por *C. ensiformis* a los 70 ddg.

Tratamientos		Ciclo de primavera		Ciclo de invierno	
		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>G. 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>R. irregulare</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	9.47 ^a	77.67a	9.26 ^a
Es χ		2.26*	0.50*	2.46*	0.33*

*Medias con letras distintas en la misma columna difieren entre sí, según prueba de Duncan ($p < 0.05$). R0: sin cepas de *Rhizobium*, R2, R3, R4, R5: cepas de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4, Can 5). *G. cubense*: *Glomus cubense*. *R. irregulare*: *Rhizoglomus irregulare*.

Producción de nódulos de *C. ensiformis* coinoculada con HMA–*Rhizobium* en los ciclos primavera e invierno a los 70 días ddg

La interacción entre los factores de estudio (HMA–*Rhizobium*) en la nodulación por *C. ensiformis* mostró diferencias ($p \leq 0.05$), con la cepa *R. irregulare* + Can 5 se obtuvo la mayor cantidad de nódulos totales 737.5 y 983.66, coincidiendo además con la mayor cantidad de nódulos efectivos 721.0 y 972.33 con respecto a los demás tratamientos inoculados y sin inocular (testigo) para los dos ciclos estudiados, respectivamente (Cuadro 4).

Resultados que están en relación con las masas de los nódulos. Lo que pudiera estar dado por la perfecta relación de simbiosis entre HMA–*Rhizobium*–leguminosas. Respecto a la disminución de nódulos efectivos en el ciclo de invierno se plantea, que es posible que, en este período, se produzca 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). Rivera y Fernández (2003) plantearon que, en este tipo de asociaciones, el *Rhizobium* puede ceder a la planta nitrógeno en forma asimilable para la misma, y a su vez, la planta suministra las sustancias nutritivas que necesita el *Rhizobium* para cumplir sus funciones vitales. Por otra parte, las micorrizas pueden incrementar la absorción de otros elementos, entre ellos el fósforo, importante para garantizar una adecuada FBN y crecimiento de la planta (Tamayo *et al.*, 2015), y estos cuando son combinados con rizobios se incrementa el número de nódulos, masa de los nódulos y mayores contenidos de P y N en las plantas (Martín *et al.*, 2017a; Tamayo-Aguilar *et al.*, 2020).

Cuadro 4. Efecto de la coinoculación de HMA y *Rhizobium* en la producción de nódulos por la *C. ensiformis* a los 70 ddg.

Tratamientos		Ciclo primavera			Ciclo invierno		
		Nódulos totales	Nódulos efectivos	Masa de los nódulos	Nódulos totales	Nódulos efectivos	Masa de los nódulos
Sin HMA	R0	433.66k	417.0j	19.93j	416.5k	411.5h	14.92i
	R2	528.66i	515.66i	26.8hg	463.5ij	439.0gh	24.45cde
	R3	555.0h	545.66h	27.783g	507.25gh	497.25ef	22.72efg
	R4	506.33g	490.33i	23.3i	439.0jk	430.0h	20.92gh
	R5	585.33g	582.0g	29.33fg	485.75hi	473.75fg	21.87fgh
<i>G. cubense</i>	R0	510.66ij	502.33i	23.763hi	436.5jk	424.25h	17.01li
	R2	621.33f	609.66de	31.53f	575.25de	551.25d	27.75ab
	R3	587.66g	575.33g	28.43fg	539.0fg	531.0de	24.17def
	R4	650.33de	636.66de	37.8d	606.0cd	596.0c	26.75abc
	R5	670.0cd	660.0cd	39.9cde	631.75bc	618.75bc	27.72ab
<i>G.intraradices</i>	R0	642.33ef	631.0ef	36.13e	488.75hi	473.5fg	19.64h
	R2	664.66cd	657.33cd	39.16de	516.0gh	494.75ef	24.81cde
	R3	684.66c	678.66c	42.96c	563.25fg	552.0d	26.02bcd
	R4	787.33b	783.33b	47.23b	662.75b	638.25b	28.50ab
	R5	983.66a	972.33a	53.86a	737.5a	721.0a	29.0a
Es X		7.31*	8.54*	1.07*	11.15*	13.05*	0.81*

*Medias con letras distintas en la misma columna difieren entre sí, según prueba de Duncan ($p < 0.05$). R0: sin cepas de *Rhizobium*, R2, R3, R4, R5: cepas de *Rhizobium* (Can 2, Can 3, Can 4, Can 5). *G. cubense*: *Glomus cubense*. *R. irregulare*: *Rhizoglomus irregulare*.

Con relación a la cantidad de nódulos efectivos, se observó que Can 5 seguida de Can 4 + *R. irregulare*, generaron los de mejores resultados, predominando el color rojo para ambas pruebas. Efecto atribuido a la acción de la enzima nitrogenasa encargada de transformar el nitrógeno atmosférico en amoníaco, lográndose a través del pigmento conocido como Leghemoglobina, que es la responsable del color rojo que se observó en el interior de los nódulos al realizarle el corte (Hernández *et al.*, 2012). Lo que demuestra que la interacción simbiótica entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las leguminosas se establece a través de un intenso intercambio de señales entre ambos simbioses, donde se destaca la liberación de compuestos isoflavonoides por la raíz, que inducen la síntesis de los factores de la nodulación en la bacteria (Freixas *et al.*, 2010).

También se observó, que los nódulos de mayor efectividad fueron aquellos situados en el cuello de la raíz, y los ubicados en el tercio superior de la misma. Los nódulos ubicados por debajo del tercio superior de la raíz y en raíces secundarias, fueron menos eficientes debido a que no estuvo presente el color rojizo intenso, lo que indica la no posibilidad de fijar nitrógeno por su inactividad. En este sentido, Córdova *et al.* (2011) observaron nódulos en *C. ensiformis* con características morfológicas variables como superficie rugosa, forma irregular y ubicada en todo el sistema radical generalmente, en la parte superior de la raíz principal y en el cuello de la raíz en suelos ácidos de Tabasco, México. Con relación a ello, Puerta *et al.* (2008) en extracción total de nutrientes en leguminosas encontraron que la masa de nódulos fue superior en

C. ensiformis seguido de *Cajanus cajan*, en comparación del resto de las leguminosas, por lo que éstas dispusieron de mayor cantidad de asimilados para la formación de los nódulos. Por su parte López *et al.* (2000) caracterizaron la nodulación de *C. ensiformis*, *Crotalaria juncea* y *Sesbania rostrata* en suelos afectados por la salinidad, y encontraron que *C. ensiformis* presentó mayor predominio de la nodulación en la raíz principal, prevaleciendo el color rojo en la parte interna de los nódulos. Lo que demostró la presencia de cepas de *Rhizobium* efectivas en el suelo para esta especie.

Claudia *et al.* (2008) encontraron interacción al evaluar 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 en las raíces principales con cepas nativas, los que probablemente se encontraban fijando N₂ por la presencia de la leghemoglobina. Hernández *et al.* (2012) y Hernández *et al.* (2017) al realizar la caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la *C. ensiformis* en diferentes tipos de pH alcanzaron diferencias significativas en el diámetro de sus colonias. Conjuntamente la leguminosa forrajera *Clitoria ternatea*, cultivada en suelos salinos, aumentó en la nodulación y en la masa seca de las plantas comparado con un testigo sin inocular. Estudios recientes por Hernández *et al.* (2020) demostraron un aumento significativo en el número de nódulos totales y efectivos, así como la masa seca de los nódulos totales en plantas de Kudzu inoculadas con aislados de rizobios, cultivadas en un suelo ácido petroférico ferruginoso nodular Gleysol.

CONCLUSIONES

C. ensiformis D.C tuvo respuesta a la coinoculación combinada con cepas de *Rhizobium* y HMA, mostrándose como cepas más eficientes la *R. irregulare* y la Can 5 en un suelo Pardo Sialítico Mullido Carbonatado; como se muestra en las evaluaciones realizadas, número de esporas, porcentajes de colonización micorrízica, densidad visual y producción de nódulos efectivos, lo que corroboró los criterios de baja especificidad cepa eficiente–cultivo.

LITERATURA CITADA

- Avio, L., A. Turrini, M. Giovannetti and C. Sbrana. 2018. Designing the ideotype mycorrhizal symbionts for the production of healthy food. *Front. Plant Sci.* 9: 1089. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01089>.
- Azcón, R.; R. Rubio y J.M. Barea. 1991. Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains and their effect on growth N₂ fixation (¹⁵N) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytol.* 117: 399-404.
- Bustamante, C., A. Pérez-Díaz, R. Viñals, R. Rivera, G. Pérez y M. Rodríguez. 2009. Efecto de la inoculación con cepas de *Rhizobium* sobre indicadores de crecimiento y producción de biomasa por *Canavalia ensiformis* L. intercalada con café en suelo Pardo de Cuba. En: Resúmenes de la XXIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología y I Conferencia Iberoamericana de Interacciones Microorganismo-Planta-Ambiente. La Habana, Cuba.
- Bustamante, C., R. Rivera, G. Pérez y R. Viñals. 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.
- Cerón, L.E. y F.A. Aristizábal. 2012. Dinámica del ciclo de nitrógeno y fósforo en suelos. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 9:285-295.
- Claudia, G.; R. Castillo, H. Rubio, S. Urzúa y B. Fernando. 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.
- Córdova, S.; M. Estrada, S. García, J.D. López, J.A. Núñez, J.J. Cabriales, L.C. Espinoza y R. Navarro. 2011. Biological nitrogen fixation by three fabaceas (Leguminosae) in acid soil of Tabasco, Mexico. *AIA.* 15(1). 31-50.

- Díaz, F.A. y C.I. Garza. 2007. Growth of sorghum and safflower genotypes associated with arbuscular mycorrhizal colonization in low fertility soil. *Universidad y Ciencia*. 3 (1):15-20.
- Fernández, F.; R. Gómez, L. Vanegas, M. Martínez, B. de la Noval y R. Rivera. 2000. Producto inoculante micorrizógeno. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. La Habana, Cuba. Certificado Nro. 22641.
- Freixas, J.A., M.I. Reynaldo y C.M. Nápoles. 2010. Influencia de la sequía sobre el metabolismo del nitrógeno fijado durante la simbiosis *Bradyrhizobium*-Soya. *Cultivos Tropicales*. 31(2). 66-73.
- García, M.; E. Treto y M. Álvarez. 2002. Época de siembra más adecuada para especies promisorias de abonos verdes en las condiciones de Cuba. *Cultivos tropicales*. 23 (1): 5-14.
- García-Rubido, M.; R. Rivera, Y. Cruz, Y. Acosta y J. Ramón. 2017. Respuesta de *Canavalia ensiformis* L. a la inoculación con diferentes cepas de hongo micorrízico arbuscular en un suelo FARL. *Culti. Tropic*. 38: 7-12.
- Gerdemann, J.W. and T.H. Nicholson. 1963. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- Giovannetti, M. and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Helyar, K.R. 2003. The symptoms and effects on plants of nutrient disorders in acid soils. 3rd Australian New Zealand Soils Conference University of Sydney, Australia.
- Hernández, G. y A. Torres. 2002. Efectos del Biostan sobre la productividad biológica y agronómica en *Phaseolus vulgaris* L. de grano negro var. criollo en condiciones de producción. AGROTROP-2002. Resúmenes. Universidad Agraria de La Habana.
- Hernández, I.; M. García; G. Hernández, R. Pérez, J. Rosales. y R.R. Gordillo. 2012. Caracterización fenotípica de aislados de rizobios procedentes de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*. 33(4). 21-28.
- Hernández, I.; M.C. Nápoles-García, P.R. Rosales-Genquí, J.F. Ramírez-Pedroso y S.P. Ponte-Betancourt. 2017. Tolerancia a la acidez de rizobios provenientes de nódulos de *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*. 38 (3): 55-57.
- Hernández, I.; P.R. Rosales, P.J. González, J.F. Ramírez, M.C. Nápoles and R. Pérez. 2020. Increase in the development of *Pueraria phaseoloides* (tropical Kudzu) due to tolerant acid rhizobia under acidity and low fertility conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(1), 113-124.
- Hernández, J.A.; J.M. Pérez y N. Castro. 2015. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. edit. Edi. INCA. Mayabeque. 93 p. http://ediciones.inca.edu.cu/files/libros/clasificacionsueloscuba_%202015.pdf.
- Herrera, R.A.; R.L. Ferrer; E. Furrázola y M.O. Orozco. 1995. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas (va) en un bosque tropical. Biodiversidad en Ibero América: Ecosistemas, Evolución y Proceso Sociales. Maximina Monasterio. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma XII. Diversidad Biológica. Mérida, Yuc, México.
- Joao, J.P.; R. Rivera, G. Martín, M. Riera y J.E. Simó 2017. Sistema integral de nutrición con HMA, abonos verdes y fertilizantes minerales en *Manihot esculenta* Crantz. *Cult. Tropic*. 38 (3): 117-128.
- López, R.; L. González, R. Ramírez, E. Cordoví, I. Gómez y P. Castillo. 2000. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas pratenses en suelos afectados por la salinidad. *Pastos y forrajes*. 23(2). 27-31 pp.
- 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. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 101 p.
- Martín, G.M.; L. Arias y R. Rivera, R. 2010. Selección de las cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) más efectivas para la *Canavalia ensiformis* cultivada en suelo ferralítico rojo. *Cultivos Tropicales*. 31(1). 27-31.
- Martín, G.M.; Y. Tamayo, I. Hernández, M. Varela y E. da Silva. 2017a. Cuantificación de la fijación biológica de nitrógeno en *Canavalia ensiformis* crecida en un suelo pardo mullido carbonatado mediante los métodos de abundancia natural de ¹⁵N y diferencia de N total. *Cult. Tropic*. 38: 122-

130.

- Martín, G.M.; Y. Tamayo, J.F. Ramírez, M. Varela y R. Rivera, R. 2017b. Relación entre la respuesta de *Canavalia ensiformis* a la inoculación micorrízica y algunas propiedades químicas del suelo. *Cult. Tropic.* 38:24-29.
- Martín, G.; R. Reyes y J.F. Ramírez. 2015. Coinoculación de *Canavalia ensiformis* L. D.C. con *Rhizobium* y Hongos micorrízicos arbusculares en dos tipos de suelos de Cuba. *Cult. Tropic.* 36(2): 22-29.
- Martínez, R.; M. López, B. Dibut, C. Parra y J. Rodríguez. 2007. La fijación del nitrógeno atmosférico en condiciones tropicales. Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria. 166 p.
- Martínez-Viera, R. y A.B. Dibut. 2012. Biofertilizantes bacterianos. Editorial científico técnica, La Habana, Cuba. 279 p.
- Martino, C.D.; F. Fioretto, D. Palmieri, V. Torino and G. Palumbo. 2019. Influence of tomato plant mycorrhization on nitrogen metabolism, growth and fructification on P-limited soil. *J. Plant Growth Regul.* 38: 1183–1195. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09923-y>.
- Padrón-Rodríguez L.; R.M. Arias-Mota, R. Medel-Ortiz y Y. De la Cruz-Elizondo. 2020. Interacción de hongos micorrízicos arbusculares y una cepa fosfato solubilizadora en *Canavalia ensiformis* (Fabaceae). *Botanical Sciences.* 98(2): 278-287, <https://doi.org/10.17129/botsci.2476>.
- Phillips, D.M. y D.S. Hayman. 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.
- Puertas, F.; E. Arévalo, L. Zúñiga, J. Alegre, O. Loli, H. Soplin y V.C. Baligar. 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.
- Rabie, G.H.; M.B. Aboul-Nasr and A. Al-Humiany. 2005. Increased salinity tolerance of cowpea plants by dual Interacción inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* and a nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. *Mycobiology* 33: 51-60.
- Rivera, R. 2010. Abonos verdes e inoculación micorrízica de posturas de cafeto sobre Suelos Fersialíticos Rojos Lixiviados. *Cultivos Tropicales.* 31 (3): 77-79.
- Rivera, R. y K. Fernández. 2003. Bases científico-técnicas para el manejo de los sistemas agrícolas micorrizados eficientemente. In: Rivera, R. y Fernández, K. (eds.). *Manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe.* INCA. La Habana, Cuba. 166 p.
- Rivera, R.; F. Fernández, K. Fernández, L. Ruiz, C. Sánchez and M. Riera. 2007. Advances in the management of effective arbuscular mycorrhizal symbiosis in tropical ecosystems. In: *Mycorrhizae in Crop Production* (eds.) Chantal Hamel and Christian Plenchette. Haworth Press, Binghamton. 67 NY. pp. 151–196.
- Rivera, R.; G. Martín, J. Simó, G. Pentón, M. García-Rubido, J.F. Ramírez, P.J. González, P.J. Joao, L. Ojeda, Y. Tamayo-Aguilar and C. Bustamante. 2020. Benefits of joint management of green manure and mycorrhizal inoculants in crop production. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23(3): 1-18.
- Ruiz, 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.
- Sánchez, C.; R. Rivera, D. Caballero, R. Cupull, C. González y S. Urquiaga-Caballero. 2011. Abonos verdes e inoculación micorrízica de posturas de cafeto sobre suelos Ferralíticos Rojos Lixiviados. *Cult. Tropic* 32 (3):11–17.
- Simó, J.E.; R. Rivera, L. Ruiz and G. Martín. 2020. The Integration of AMF Inoculants, Green Manure and Organo-Mineral Fertilization, in Banana Plantations on Calcic Haplic Phaeozems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23, #08. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2882/1367>.

- Simó, J.E.; R. Rivera, L. Ruíz, D. Díaz and M. Ruíz. 2019. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi inoculated on *Canavalia ensiformis* L. in Calcaric Histosol soils. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2): 395-405.
- Tamayo, Y.; G. Martín, Y. Corona y F. Barraza. 2015. Respuesta de la *Canavalia ensiformis* L. D.C. ante la coinoculación de *Rhizobium* y hongos micorrízicos arbusculares. *H. Cien. Tecn.* 19: 100–108.
- Tamayo-Aguilar, Y.; P. Juárez-López, W. Capdevila-Bueno, W.; J. Lescaille-Acosta y E. Terry-Alfonso. 2020. Bioproductos en el crecimiento y rendimiento de *Phaseolus vulgaris* L. var. Delicia 364. *Terra Latinoamericana* Número Especial 38-3: 667-678. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.672>.
- Trouvelot, A.; J. Kough and V. Gianinazzi-Pearson. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de methodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Proc. 1st Eur Symp on Mycorrhizae: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae, Dijón. INRA. Paris, Francia.
- 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 (Coloia). Tesis en opción al Grado de Maestro en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. 96 p.
- Wilches-Ortiz, W. A.; M.M. Ramírez-Gómez, U.A. Pérez-Moncada, D.P.A. Serralde-Ordoñez, M. Peñaranda-Rolon and L. Ramírez. 2019. Association of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) with sugarcane plants (*Saccharum officinarum*) for panela production in Colombia. *Terra Latinoamericana* 37: 175-184. <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.481>.