



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Agronomía – Maracay
Postgrado en Ciencia del Suelo

Efecto de *Rhizobium* y micorrizas arbusculares en el desarrollo de *Cajanuscajan* en presencia de abonos verdes, en suelos naturales de la localidad de Espino estado Guárico.

Carmen Teresa Yurymar Parra Zambrano

Tesista

Julio 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 de grado presentada como requisito final para optar al título de **MAGISTER SCIENTIARUM EN CIENCIA DEL SUELO**

Estudiante: Carmen Parra

Dra. Marcia Toro

Tutora

DEDICATORIA

Al ser supremo que ilumina todos los caminos a donde voy,

A Camilita y Juan Pablito,

A mi compañero fiel Johnny

A mi hermana Dayana,

Y a mis padres Nelly y Luis

RESUMEN

Efecto de *Rhizobium* y micorrizas arbusculares en desarrollo de *Cajanus cajan* en presencia de abonos verdes, en suelos naturales de la localidad de Espino estado Guárico.

Se realizó un estudio en microcosmos, en condiciones de invernadero, con un suelo proveniente de la Localidad de Espino estado Guárico, de baja fertilidad. En este estudio se simuló el efecto de las prácticas conservacionistas aplicadas en el campo incorporando abonos verdes para mejorar la condición física y nutricional del suelo; posteriormente se aplicaron microorganismos como rizobios y micorrizas arbusculares al cultivo indicador, *Cajanus cajan* (quinchoncho), a fin de evaluar si la adición de los residuos aplicados junto con la inoculación favorecía el desarrollo del quinchoncho. Los tratamientos utilizados como abonos verdes estaban constituidos por dos especies de leguminosas, *Crotalaria juncea*, adicionada como residuos de crotalaria (RC) y añil (*Indigoferalespedizioides*) añadida como residuos de añil (RA); una gramínea (*Sorghum bicolor*), adicionada como residuos de *sorgo* (RS) y el tratamiento sin residuo (SR), que constituyó la condición natural del suelo.

Todos los abonos verdes se dejaron crecer hasta 45 días, luego se cortaron e incorporaron al suelo simulando las prácticas de campo. Con la finalidad de observar la dinámica de los elementos N y P en el suelo a consecuencia de la mineralización de los residuos añadidos, se tomaron muestras de suelo a intervalos de 3,6,9,15,22 y 29 días, después de incorporados los residuos, y se determinaron los contenidos de nitrógeno inorgánico y fósforo disponible. Los resultados sugieren que los residuos orgánicos se habían mineralizado a los 15 días de incubación.

Una vez descompuestos los residuos orgánicos, se desarrolló sobre los microcosmos el cultivo indicador, *Cajanus cajan*, inoculado con los biofertilizantes rizobios y micorrizas arbusculares, según las siguientes combinaciones: sin aplicación de microorganismos (SM), con rizobios (Rh), con micorrizas (MA), con Rh+MA y Rh+Ma (en suelo estéril). Se evidencian los efectos positivos que tienen la inoculación de microorganismos (micorriza y Rizobios) sobre el crecimiento del quinchoncho, ya que todos los tratamientos con aplicación de microorganismos de forma conjunta y/o por separado mostraron mayores valores de biomasa que sus respectivos controles, particularmente en el caso de ausencia de residuos añadidos.

Palabras claves: Abonos verdes, rizobios y Micorrizas arbusculares

SUMMARY

A study in microcosms containing an acid, low fertility soil native from Espino, Guarico state, was developed under greenhouse conditions. It simulated the effect of conservation practices applied in the field, incorporating green manures to improve physical and nutritional soil condition. Microorganisms as rhizobia and arbuscularmycorrhizae, were subsequently applied to the studied crop, *Cajanuscajan* (pigeon pea), in order to evaluate whether the addition of cover crops and biofertilization, improved pea production. Two legume residues were applied as green manures, *Crotalaria juncea*, (CR) and añil or indigo (*Indigosphaeralespedicioides*) (RA); grass residues (*Sorghum bicolor*), were also added (RS). A treatment without plant residues (SR), representing the natural condition of the soil, was also included.

The cover crops were grown to 45 days, then cut and incorporated into the soil simulating field practices. In order to observe the dynamics of N and P in the soil as result of plant residues mineralization, soil samples were taken at intervals of 3,6,9,15,22 and 29 days, after residues were added. Inorganic nitrogen and phosphorus contents suggested that plant residues were mineralized after 15 days of incubation.

After residues mineralization, two plants of *Cajanuscajan* inoculated with rhizobia and/or arbuscularmycorrhizae were developed in each microcosm during 8 weeks, according to the following combinations: without microorganisms (SM), rhizobia (Rh), mycorrhizae (MA), rhizobia + mycorrhizae (Rh + MA); an additional treatment, rhizobia + mycorrhizae (Rh + MA) in sterile soil, was used as microorganisms control.

Positive effects on growth and nutrition of pigeon pea were evident with the inoculation of mycorrhiza and/or rhizobia, when grown without plant residues. excess of ^{15}N atoms indicated that mycorrhizae and/or rhizobia inoculation favoured N biological fixation. *C.cajan* inoculated or not was not favoured by cover crops mineralization. Secondary metabolites and or the amount of N and P produced by plants mineralization could affect microorganismsefectivity.

Keywords: Green manures, rhizobia and arbuscular mycorrhizal

INDICE DE CUADROS	PAGINA
Cuadro 1: Características del suelo utilizado en microcosmo para el cultivo de <i>Cajanus cajan</i>	20
Cuadro 2. Tratamiento en el ensayo de microcosmos de plantas de <i>Cajanuscajan</i> en condiciones de invernadero para determinar la efectividad de los simbios (rizobios y MA) en presencia de abonos verdes	30
Cuadro 3. Ordenamientos de los tratamientos utilizados en el ensayo de microcosmos de plantas de <i>Cajanus cajan</i> en condiciones de invernadero para determinar la efectividad de los simbios (rizobios y MA) en presencia de abonos verdes	34
Cuadro 4. Materia seca de <i>Cajanus cajan</i> (g) desarrollado durante 8 semanas con sus respectivas combinaciones de tratamientos	42
Cuadro 5. Contenido de P (mg P/g psec) parte foliar de <i>Cajanus cajan</i> desarrollada durante 8 con los diferentes residuos y combinaciones de microorganismos	44
Cuadro 6. % exceso de átomos de ¹⁵ N de la parte foliar de <i>Cajanus cajan</i> desarrollado durante ocho semanas con los diferentes tratamientos de abonos verdes y combinaciones de microorganismos	46
Cuadro 7. Contenido de nitrógeno (%) en el vástago de <i>Cajanus cajan</i> desarrollado durante 8 semanas con los tratamientos de residuos y las diferentes combinaciones de microorganismos	50
Cuadro 8. Número (No) y peso fresco de nódulos (g) de plantas de <i>Cajanus cajan</i> desarrolladas durante 8 semanas con los tratamientos de residuos en combinación con inoculantes rizobios y micorrizas arbusculares.	52
Cuadro 9. Longitud de raíces (LR) y % de longitud de raíces colonizadas (%LRC) por MA de plantas de <i>Cajanus cajan</i>	55

INDICE DE FIGURAS**PAGINA**

Figura 1. Aplicación rizobios, en microcosmos a plantas de <i>C. cajans</i>	31
Figura 2. Liberación de nitrógeno de los tratamientos utilizados como residuos	36

vegetales de sorgo (*Sorghum bicolor*), crotalaria (*Crotalaria juncea*) y añil (*Indigoferalespedizoides*)

Figura 3. Liberación de fósforo de los tratamientos utilizados como residuos vegetales de sorgo (*Sorghum bicolor*), crotalaria (*Crotalaria juncea*) y añil (*Indigoferalespedizoides*) **39**

TABLA DE CONTENIDO	PÁGIN
	A
DEDICATORIA	I
RESUMEN	II
SUMMARY	II
INDICE DE CUADRO	IV
INDICE DE FIGURAS	V
TABLA DE CONTENIDO	VI
I. INTRODUCCIÓN	1

II. OBJETIVOS

- 2.1 Objetivo general 6
 2.2 Objetivo específicos 6

III. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

- 3.1 Importancia de la fertilización biológica 7
 3.2 Asociaciones rizobios-leguminosas 8
 3.3 Clasificación taxonómica de las bacterias diazotroficas 9
 3.4 Especificidad en la infectividad y en la efectividad 10
 3.5 Factores limitantes de la FBN en las asociaciones rizobios-leguminosas 10
 3.6 Papel de las micorrizas en la nutrición de las plantas 11
 3.7 Otros efectos benéficos de las micorrizas caso especial: micropropagacion 13
 3.8 Interacción entre las micorrizas arbusculares y rizobios 14
 3.9 Importancia de la fertilización orgánica 15
 3.10 Usos de Abonos Verdes 15
 3.11 Especies utilizadas como abono verde 16
 3.12 Cuantificación de la fijación biológica de N₂ mediante el uso de ¹⁵N 17

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

- 4.1 Descripción del suelo utilizado 20

V. FASE EXPERIMENTAL I: ESTABLECIMIENTO DE LOS ABONOS**VERDES EN ENSAYOS DE MICROCOSMOS EN INVERNADERO**

- 5.1 Preparación del suelo 21
 5.2 Siembra de abonos verdes 21

VI. FASE EXPERIMENTAL II: CARACTERIZACIÓN Y**AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS SIMBIONTES**

- 6.1 Establecimiento de macetas trampas para obtención de inóculos de hongos 23
 Glomeromycota, formadores de la micorriza arbuscular
 6.2 Tinción de raíces micorrizadas 23
 6.3 Cuantificación del inóculo a través de la colonización de la raíz y el número 24
 de esporas.
 6.4 Separación de las esporas de MA del suelo 25
 6.5 Valoración del inoculo con hongos formadores de micorrizas arbusculares 25
 para el cultivo indicador *Cajanuncajan*
 6.6 Obtención de Rizobios a partir de nódulos de *Cajanuscajans* 26
 6.7 Aislamiento del rizobios a partir de nódulos 27

VII APLICACIÓN DE LAS ENMIENDAS QUIMICAS, DOSIS Y**FUENTES**

- 7.1 Dosis aplicada de fertilizante marcado con ¹⁵N 29

VIII. FASE EXPERIMENTAL IV: ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO 29

INDICADOR	
8.1 Determinaciones realizadas a la planta	31
8.2 Análisis químicos realizados	32
8.3 Determinación de las características morfológicas de la raíz	33
8.4 Porcentaje de longitud de raíz colonizada por micorrizas arbusculares	33
8.5 Cuantificación y peso de nódulos	33
8.6 Longitud radical	33
IX. Análisis estadístico aplicado a los datos	34
X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
10.1 Efecto de los residuos vegetales incorporados para la variable Nitrógeno Inorgánico y fosforo disponible en suelo	35
10.2 Desarrollo de plantas de quinchoncho (<i>Cajanuncajan</i>) cultivadas en presencia delos residuos de distintas especies vegetales e inoculadas con rizobios <i>sp</i> y micorrizas arbusculares.	41
XI. CONCLUSIONES	57
XII. REVISION BIBLIOGRAFICA	58

I. INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre suelos realizados en el país, han permitido verificar la gran diversidad y heterogeneidad de las condiciones edáficas, con una amplia variación en sus propiedades químicas, físicas y biológicas.

Se encuentran suelos desde ligeramente ácidos hasta fuertemente ácidos con problemas de toxicidad por aluminio, limitando la generación de prácticas conducentes a incrementar la producción óptima de los cultivos. **López et al., 1987** señala que alrededor del 70% de los suelos del país presentan como primera o segunda limitación para uso agrícola la baja fertilidad natural y su reacción ácida.

La baja capacidad productiva de los suelos se atribuye a factores edáficos, relieve, clima, prácticas de cultivos y manejo inadecuado de los sistemas de producción. Una de las prácticas para mejorar la fertilidad de estos suelos es el uso de altos volúmenes de fertilizantes inorgánicos de los tipos fosfatados y nitrogenados, que por un manejo pueden ser retenidos por el suelo o contaminar fuentes de agua con nitratos. Por esta razón es necesario proponer prácticas que promuevan la sustentabilidad de suelos y a su vez del conjunto factores que integran los agroecosistemas.

La sustentabilidad se basa en el uso y manejo efectivo de los recursos internos de los agroecosistemas (**Altieri, 1994**). Esto requiere con frecuencia un manejo distinto diferente al que prevalece en el sistema agrícola actual, el cual atiende más a realidades económicas

o geopolíticas que a realidades ecológicas. Se trata entonces de ir hacia la utilización de los insumos propios presentes en los sistemas a estudiar

Según estos conceptos, el suelo es considerado como un sistema de estudio, lleno de recursos disponibles para ser usados, entre los cuales se encuentran, los microorganismos del suelo. Estos realizan funciones que son esenciales para mantener el equilibrio y productividad de los sistemas agrícolas, por lo que constituyen una fracción primordial de la biodiversidad terrestre al participar en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, descomposición de la materia orgánica, modificación de la estructura del suelo, regulación de la composición atmosférica, control biológico de plagas y enfermedades y en la degradación de compuestos xenobióticos. La composición de esta biota puede ser manipulada por el hombre, casi siempre de forma temporal, para mantener e incrementar la productividad de un suelo.

Umarov (2001) indica que la humanidad está incrementando los usos de las actividades microbiológicas en los suelos para propósitos agrícolas: la mayoría de prácticas de manejo de campo (labranza, fertilización, entre otros.) apuntan hacia incrementar la tasa de retorno biológico de los elementos químicos y su disponibilidad para las cosechas agrícolas.

La necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios de síntesis ha dado vigencia a la inoculación con los organismos beneficiosos. En efecto, la demanda impuesta por la sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola nos conduce al uso de estrategias que mantengan una producción competitiva y la protección del medio ambiente. Una de las alternativas más prometedoras es el uso de inoculantes microbianos, tales como rizobios, micorrizas (**Toro, 2008**).

La inmensa mayoría de las plantas que crecen sobre la corteza terrestre viven asociadas, en forma de simbiosis mutualísticas, con ciertos hongos del suelo lo que da lugar a las llamadas micorrizas u hongos de la raíz (**Azcón-Aguilar y Barea, 1980**). El hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, y llega a ser parte integrante de la misma, a partir de ésta se desarrolla el micelio externo, que a modo de sistema radical complementario y altamente efectivo, ayuda a la planta a adquirir nutrimentos y agua. En general los efectos directos de la simbiosis sobre la nutrición mineral son más notorios en aquellos nutrientes que son poco móviles y están presentes en bajas concentraciones en la solución del suelo, como es el caso de fósforo, amonio, potasio, zinc y cobre (**Marschner y Dell, 1994**).

Las Micorrizas generan muchos beneficios entre los cuales se encuentra: estimulación del ritmo de crecimiento de las plantas e incremento de la producción de biomasa. Esto se atribuye a que mejoran la nutrición mineral. Además pueden estimular la fijación biológica de nitrógeno (**Toro et al., 1998**).

Para ello se propone utilizar los recursos biológicos mediante el aislamiento de microorganismos desde sus hábitats naturales, de forma tal reproducirlos y luego hacer inoculaciones en campos de cultivo de donde fueron extraídos a manera de práctica agrícola no destructiva ó conservacionista (**Barea y Olivares, 1998 y López et al., 2006**).

El nitrógeno juega un papel fundamental en los sistemas agrícolas, básicamente por ser uno de los elementos esenciales para el desarrollo de los cultivos. Se conoce que la vía normal de ingreso de este elemento a las plantas proviene del suelo, y ésta lo utiliza como nitrato (NO_3) y amonio (NH_4). Sin embargo debido a que se acumula principalmente en formas orgánicas, en el suelo, se hace necesaria su transformación microbiana, conocida como mineralización de nitrógeno y así dejarlo disponible para los cultivos (**Echeverría et al., 1996**).

Actualmente la genética permite la utilización de plantas con potenciales productivos cada vez mayores, que demandan una nutrición nitrogenada la cual en algunos casos puede ser superior al aporte N suministrado por el suelo, por lo tanto en la mayoría de los cultivos es necesario suplementar con fertilizantes nitrogenados. Sin embargo a través de la vía de la fijación biológica nitrógeno (FBN), realizada por microorganismos del suelo, las plantas pueden obtener el N necesario para su desarrollo.

En esta investigación, nos centraremos en la denominada FBN, específica para la familia de las Leguminosas. A través de este mecanismo es posible obtener un significativo aporte de nitrógeno para las especies vegetales de esta familia. Las plantas se asocian simbióticamente con las bacterias de los géneros, *rhizobium*, *bradyrhizobium*, entre otros, que fijan el N₂ a través de la nitrogenasa y lo suministran a la planta transformado en formas asimilables; la planta a su vez suministra de carbohidratos a la bacteria, estableciéndose una relación de beneficio mutuo entre ambos organismos **(Soto-Urzuva y Baca, 2001)**.

La fijación de N₂ por la simbiosis entre leguminosas y bacterias es un recurso natural capaz de satisfacer una de las mayores necesidades de la agricultura mundial tal como proveer N de bajo costo para mejorar los rendimientos y la calidad de los cultivos, proteger a los suelos de la erosión y a las aguas de la contaminación **(Becana y Bedgar, 1991)**.

Es importante decir que estas prácticas biológicas, no suplen la totalidad de los nutrimentos requeridos a través de la fertilización convencional, por lo tanto es necesario establecer junto con la inoculación de los microorganismos, la aplicación de abonos verdes, rocas fosfóricas, fertilizantes inorgánicos potásicos y/o microelementos entre

otros, que permitan completar los requerimientos nutricionales exigidos por el cultivo de interés agrícola.

En base a esto, esta investigación pretende ofrecer una alternativa de manejo para los suelos ácidos mediante el uso de abonos verdes incorporados al suelo, que contribuyen a estimular su actividad biológica y estructura. Además se propone la utilización de microorganismos autóctonos de la zona que sean eficientes en la FBN como rizobios, aquellos que incrementan la absorción de fósforo del suelo como las micorrizas en *Cajanus cajan* fabácea nativa presente en las sabanas naturales localizada en la localidad de Espino Edo Guárico que permitan contribuir a la puesta en marcha de tecnologías que contribuyan a la sustentabilidad de los agroecosistema.

II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de los simbiontes rizobios y micorrizas arbusculares y de la incorporación de abonos verdes al suelo en desarrollo de *Cajanus cajan*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la velocidad de mineralización de los abonos verdes incorporados al suelo en ensayos de microcosmos.
- Aislar rizobios nativos y de hongos micorrízicos arbusculares del suelo de la localidad de Espino a utilizar en ensayos de microcosmos con *Cajanus cajan*.
- Evaluar el desarrollo y crecimiento de *Cajanus cajan* inoculado con rizobios y hongos de la micorriza arbuscular nativos del suelo de Espino en microcosmos con la aplicación de diferentes abonos verdes.
- Evaluar el efecto de la inoculación de rizobios nativos en la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno mediante la técnica de dilución isotópica con N¹⁵

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importancia de la fertilización biológica

Desde el punto de vista agrícola, el suelo se considera un recurso natural fundamental para el desarrollo de los cultivos, y de ahí la necesidad de mantener su productividad; este recurso forma parte integral del agroecosistema y sus características dependen de factores interactivos como material parental, clima, topografía, organismo biológicamente activos y tiempo. Partiendo de esta premisa se deben aplicar prácticas de manejo agroecológico, que promuevan un sistema productivo sustentable en tiempo determinado.

Estas prácticas de manejo agroecológico o ancestral, siempre han estado presentes en el suelo, pero fueron distorsionadas en la época de la revolución verde, por la imperiosa necesidad que hubo de incrementar la productividad de los cultivos sin tomar en cuenta los efectos negativos causados al ambiente y a los seres humanos.

Para el rescate de estas prácticas agroecológicas, es necesario tomar en cuenta las características físicas, químicas y biológicas del suelo, siendo este último aspecto, el tema de estudio a resaltar en esta investigación. Cabe destacar específicamente la rizósfera, zona del suelo que rodea las raíces de las plantas, y en la cual se encuentran una gran cantidad de microorganismos benéficos, dentro de los cuales se destacan los que son capaces de suplir una parte importante de los fertilizantes inorgánicos de uso convencional. Para utilizar estos atributos del suelo como práctica de manejo, se enriquece la rizósfera con

los microorganismos de interés (bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, hongos micorrízicos) a través de la producción de inoculantes.

En Venezuela existen aproximadamente un 73 % de suelos con limitaciones para la producción agrícola, resaltando la condición de suelo ácido (**Comerma y Paredes, 1978**). El aislamiento de microorganismos de zonas agroecológicas de interés, representan una posibilidad de mejorar la fertilización de los cultivos mediante su uso. De allí la gran importancia dada en la actualidad a los inoculantes de origen microbiano como unas de las prácticas de manejo de los agroecosistemas, con el propósito de reducir los niveles de contaminación ambiental y contribuir a la mejoría de la calidad de vida de los productores y consumidores.

Entre los avances de investigación en el área de bioinsumos agrícolas, está el uso de bacterias simbióticas y hongos especializados en la captación del fósforo del suelo debido a la capacidad de suplementar o movilizar nutrientes. Además estos procesos son relativamente rápidos y pueden aplicarse en pequeñas unidades para solucionar problemas locales específicos.

3.2 Asociaciones rizobios-leguminosas

Las plantas de la familia que pertenecen a las leguminosas o *Leguminosae*, también son llamadas *fabaceae* o fabales, representan un grupo muy diverso en el plano taxonómico con 3 sub-familias *Caesalpinioidea*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae* y cerca de unas 3400 especies se han analizado por su capacidad para nodular.

En Venezuela La producción agrícola de leguminosas es fundamental para la alimentación nacional. En promedio según **Quintana 2001**, son una importante fuente de tres nutrientes, proteínas, hierro y vitamina B1, ya que ellas les aportan 14% de las proteínas,

el 20% del hierro y 23% de la vitamina B1. Se estima que para el año 2010, la oferta nacional deseable sea de 12 kilogramos por persona/año.

Por consiguiente se hace necesario que esta producción esté en equilibrio integral con los agroecosistemas, mediante la simbiosis de estas plantas con bacterias que fijan biológicamente el nitrógeno de la atmósfera, y permiten disminuir el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados que deterioran el ambiente.

En los suelos que tienen escasa disponibilidad de N, solamente los cultivos que pueden asociarse con sistemas de fijación biológica de nitrógeno tienen la posibilidad de sobrevivir (**Döbereiner et al., 1974**). En contraste con las grandes cantidades de energía fósil utilizadas para desarrollar el proceso de Haber- Bosch, en el proceso biológico la energía se deriva de la fotosíntesis, y se requieren entre 6 y 12 kg de C fotosintético para lograr la fijación de 1 kg de N₂ en la simbiosis rizobios – leguminosas (**Marschner, 1999**). De lo expuesto se deduce que éste constituye el método de suministrar N a los agroecosistemas más saludable para el ambiente (**Bohloul et al., 1992; Boddey et al., 2006**)

En las asociaciones con rizobios-leguminosas, es importante considerar la capacidad de las cepas de rizobios para activarse en la eficiencia de la FBN, de allí que **Hernandez et al., (1987)** refiere un estudio de campo se llevó a cabo en lisímetros que contienen suelo enriquecido¹⁵N, para determinar los efectos de cuatro las cepas de competitivas *Rhizobium* sobre los parámetros de rendimiento de los guisantes (*Cajanus cajan*). Las mayores diferencias se observaron en los rendimientos de semilla, cepa P132 obtuvo el mayor rendimiento de semilla (121 ± 20 g por planta), y el control de la cepa (rizobios nativos) produjo el rendimiento más bajo (43,9 ± 8 g por planta). Con la excepción de las semillas y vainas, el peso de materia seca no fueron diferentes.

Aproximadamente la mitad del N total, fueron encontrados en las plantas inoculadas con P132, mientras que el cantidad más pequeña se encontró en los controles no inoculados. P132 fue también el mejor competidor con respecto a rizobios nativos.

3.3 Clasificación taxonómica de las bacterias diazotróficas

Aquellas bacterias que son capaces de fijar nitrógeno se denominan dizotroficas, para su clasificación la mejor referencia la hace el manual del Bergey, la versión más reciente enfatiza en las características genotípicas basado en las secuencias de ARN, ADN y proteínas. Bergey (2005) define cuatro familias de los y 6 géneros rizobios: *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*.

3.4 Especificidad en la infectividad y en la efectividad

Algunas cepas de rizobios poseen un amplio rango de huéspedes, a comparación de otras que poseen un pequeño espectro y de denominan específicas, de allí que **Froni (2011)** enmarca los grupos específicos de acuerdo a las características del micro y del macrosimbionte y reconoce tres tipos de leguminosas: (1) Promiscuas en la nodulación y en la efectividad, (2) Promiscuas para la nodulación y específicas para la efectividad y (3) específicas para la nodulación y para la efectividad; y esta clasificación presenta la limitante desde el punto de vista práctico debido principalmente al universo de cepas que deben probarse en ensayos de Inoculación.

De acuerdo a los tipos de efectividad y selectividad que presentan los asociaciones del tipo simbióticas **Snard y Dogra (1997)** encontraron en plantas de *Cajanus cajan*s que cepas de *Bradyrhizobium* colonizan más rápidamente que *Rhizobium*, principalmente por que razas de crecimiento rápido son comunes en esta especie de fabácea.

3.5 Factores limitantes de la FBN en las asociaciones rizobios-leguminosas

La dinámica de estos procesos biológicos es compleja, principalmente por que engloba todo un sistema de estudio, fabáceas-rizobios-suelo y dependen específicamente de la expresión genética de los organismos involucrados y su interacción con el ambiente. De allí que en el siguiente cuadro se resume algunos de los factores físico-químicos que afectan las asociaciones bacteria-fabacea,

Factores físico-químicos	Bacteria	Fabácea
pH	Sensible a la acidez	Incidencia negativa de altas concentraciones de H ⁺ , deficiencias de Ca, Mg o toxicidad por Al, Mn.
Temperatura y Humedad	Los rizobios de fabáceas tropicales toleran amplio rango de temperaturas, sensible a los extremos; bajas temperaturas retardan la infección y formación de nódulos y altas temp. Producen nódulos con eficiencias. Altas humedades limitan la aireación y la FBN	Temperatura diurnas de 25 a 32°C para la simbiosis y el crecimiento de las plantas
Salinidad	Sensibles a valores mayores de 4 dS/m	Sensibles a la salinidad
Fuentes de C y energía	La competencia saprofítica es un atributo que tienen las cepas de rizobios	Las fabáceas ejercen efectos estimulantes sobre las poblaciones de rizobios, a través de sus exudados radicales
Fertilidad del suelo	El nitrógeno combinado afecta el desarrollo de los nódulos y por ende la FBN	Elementos esenciales Mo, Fe, S, Cu, Mg, Co, Ca, P,

3.6 Papel de las micorrizas en la nutrición de las plantas

En ecosistemas naturales, las raíces de la mayoría de las plantas están asociadas simbióticamente a hongos del suelo del orden glomales (**Morton, 1988; y Morton y Benny**

1990) formando micorrizas del tipo arbuscular, y su mayor significado desde el punto de vista agronómico es aumentar el volumen de suelo explorado por las raíces en busca de elementos de lenta difusión como fósforo, cobre y zinc (**Barea y Azcón-Aguilar, 1983**).

La mineralización del P orgánico es un factor determinante pues el P, podría ser tomado directamente del material vegetal en descomposición, ya que las raíces finas tienden a proliferar donde las concentraciones de nutrientes son altas (**Baylis 1975**) y donde exista altos niveles de micorrización.

La dependencia de las plantas a las micorrizas para tomar P del suelo está relacionada a las características de la raíz de la planta (**St. John, 1980**), es decir, en especies con raíces gruesas y sin pelos radiculares, son más dependientes a las micorrizas ya que el hongo cumplirá función de tomar el P y otros nutrientes del suelo.

La respuesta de la planta que más frecuentemente se ha descrito, y que universalmente es aceptada como principal responsable del efecto micorriza, es el incremento de la concentración y contenido en P de los tejidos vegetales. No obstante, también se han encontrado incrementos en el contenido y concentración de otros nutrientes en la planta; en unos casos, esto puede deberse a un efecto directo de la micorriza, aunque, en otros, puede ser una consecuencia de que, merced a que la planta resuelva su demanda de P, vía micorriza, ésta alcanza un equilibrio nutritivo más adecuado, por lo que las

propias raíces resultan capacitadas para captar mejor otros nutrimentos **(Barea y Azcón-Aguilar, 1983)**.

3.7 Otros efectos benéficos de las micorrizas caso especial: micropropagación

Los estudios más recientes, muestran los efectos benéficos de las micorrizas en el mejoramiento de la aclimatación de plantas micropropagadas como manzana y durazno, en la reducción de la mortalidad de plantas ornamentales y frutales, al crecer en estratos con bajos contenidos de fósforo y buena aireación, que se reflejan en el incremento del peso seco de hojas y raíces, así como una floración significativamente más precoz utilizando micorrizas del genero, *Glomus* en comparación con plantas no micorrizadas **(Barea et al., 1991; Fortuna et al., 1996)**.

Las técnicas de cultivo de tejidos in vitro, entre ellas las micropropagación o multiplicación clonal, han sido empleadas como metodologías limpias que logran aumentar significativamente los niveles de productividad de muchos cultivos. Después del enraizamiento in vitro, las vitroplantas requieren un periodo de adaptación en condiciones de vivero antes de ser llevadas a la plantación definitiva. Las técnicas de producción in vitro no sólo permiten la formación de micorrizas, sino que cuando ocurre durante fases tempranas puede ser una estrategia para mejorar el crecimiento de plantas **(Gianinazzi-Pearson et al., 1983)**.

Las MA pueden ser utilizadas en la agricultura en forma de inoculantes tanto, en vivero o durante el enraizamiento de vitroplantas, constituyéndose así en una alternativa valiosa

para solucionar problemas de micropropagación, aclimatación y nutrición de diferentes especies de importancia en la agricultura y reduciendo al mismo tiempo los costos de producción, ya que requieren una menor aplicación de insumos (**Martínez et al., 2004; Carrillo, 2000; y Jaime-Vega 2003**).

3.8 Interacción entre las micorrizas arbusculares y rizobios

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

Se mejora del desarrollo y la actividad de la simbiosis rizobio-leguminosas en condiciones de escasa humedad. Debido a la capacidad que tienen las micorrizas de absorción de agua y por lo tanto, permiten mayor resistencia de la planta a la sequía (**Corredor, 2003**).

Desde el punto de vista del gasto de energía, **Baca et al., 2000** señalan que la fijación de un mol de N_2 es muy costosa y que por cada mol de N_2 fijado se gastan unas 18 moléculas de ATP, del cual el P es parte fundamental.

De allí el gran beneficio de la doble simbiosis para las leguminosas, micorriza-rizobios, esta duplicidad simbiótica no solo beneficia a la planta y sino que a su vez existe una interrelación mutualista indirecta entre ambos microorganismos, por una parte el gran gasto energético se produce por la FBN, es compensado con el aumento de la captación de P por parte de las micorrizas. (**Toro et al., 1997, Toro et al. 1998 y Barea et al., 2002**),

entre otros, encontraron mejores valores en la fijación biológica cuando estaban asociadas con micorrizas.

Entre otros beneficios que se encuentran con la doble simbiosis, **Barcelo et al. (2008)**, señalan que *Leucaela leucocephala* en asociación con micorrizas-rizobios sirvió para restaurar suelos agrícolas contaminados con descargas industriales.

3.9 Importancia de la fertilización orgánica

La fertilización orgánica es una alternativa que muchas veces resulta de bajo costo y de fácil preparación. La principal ventaja de su aplicación es aumentar la cantidad de materia orgánica y microorganismos presentes en el suelo.

La incorporación de residuos orgánicos al suelo es una práctica cuyos efectos beneficiosos han sido aceptados a través de los tiempos, aunque fue marginada por el surgimiento de los fertilizantes sintéticos. Las modernas tendencias agroecológicas retoman estas prácticas, con el fin de reducir la exposición del suelo a procesos erosivos, lograr un mayor aporte de nutrimentos y sincronizar su liberación con las necesidades de los cultivos. Estas tendencias obligan a realizar estudios para conocer los patrones de descomposición y liberación de nutrimentos por parte de los residuos para poder lograr la sincronización deseada con el desarrollo del cultivo (**Myers et al., 1994**), aunque se debe tomar conciencia de que estas prácticas no garantizan suficientes nutrimentos en agroecosistemas grandes, pero constituyen una fuente muy importante de ellos para pequeños productores con limitado acceso al fertilizante mineral (**Palm et al., 1997**).

3.10 Usos de Abonos Verdes

El termino abono verde hace referencia a la utilización de cultivos de crecimiento rápido, que se cortan y se incorporan en el mismo lugar donde han sido sembrados, con el propósito de mejorar las propiedades físicas del suelo, y enriquecerlo con humus (**Barber et al., 1992**). En general los efectos del abono verde no acaban en el aspecto nutricional, sino que alcanzan a todos los componentes relacionados con la fertilidad global del suelo. Entre los muchos efectos benéficos a que dan lugar, **Barber et al, (1992)** destacan los siguientes:

- Estimulan la vida microbiana
- Mejoran la estructura del suelo por medio de sus raíces
- Protegen el suelo contra la erosión
- Proporcionan elementos nutritivos al cultivo siguiente
- Cuando son leguminosas, enriquecen al suelo con nitrógeno
- Suprimen el lavado de los elementos nutritivos
- Limitan la invasión de malezas

3.8 Especies utilizadas como abono verde

Las tres familias de plantas más utilizadas para tal fin, son las leguminosas, las crucíferas y las gramíneas. Las leguminosas son las más empleadas dada su alto potencial para fijar el nitrógeno de forma simbióticas en asociaciones con rizobios e incorporarlo al suelo a favor de los cultivos posteriores. Además, las leguminosas proporcionan el 90% de la fuente de calorías y hasta el 90% de la dieta proteica humana en las regiones tropicales. Entre las especies de importancia agrícola en el trópico y subtropico se encuentran: *Arachis hypogaea*, *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Glycine max*, *Mucuna pruriens*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata* y *Centrosema macrocarpum* entre otras (**Peoples y Craswell, 1992**). El quinchoncho, *Cajanus cajan* (L.), es una leguminosa de alta adaptación, con bajos costos de producción, por los que los

productos derivados de esta leguminosa son económicos y de fácil preparación. En el caso que nos ocupa, el quinchoncho fue aplicado como cultivo indicador.

El cultivo del quinchoncho, *Cajanus cajan* (L.) Millsp., cv. Aroita, utilizado en este trabajo se ha obtenido por selección sobre la línea Aroa. Posee un ciclo de 110 a 130 días a la cosecha, altura de 80 a 120 cm, flor púrpura, tallo con grosor de 12 mm de crecimiento determinado, vainas de cinco celdas granos crema y con potencial de cosecha mecanizada de grano seco. Se ha seleccionado por presentar potencial de fijación biológica de nitrógeno, además de contribuir a la sustentabilidad de los sistemas de producción de la zona de sabanas, por:

- Su alto potencial para ser utilizado como complemento en alimentación animal, pudiendo ser usado como forraje y como materia prima en la elaboración de reacciones nutricionales para la alimentación del ganado en la época seca, o bien como complemento proteico o consumo directo de los animales bajo pastoreo **(Higuera et al., 1998; Martínez et al., 2003)**.
- Por su capacidad adaptativa, ya que puede contribuir al pool de nitrógeno en el agrosistema a partir de la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico vía fijación biológica del N₂ **(España et al., 2006)**.
- La alta capacidad de adaptación a zonas adversas manifestadas a través de mecanismos fisiológicos (exudados radicales, actividad enzimática) y morfológicos (mayor longitud radical, mayor diámetro y mayor cantidad de pelos radicales) permitiéndole utilizar formas de fósforo no disponible comúnmente a las plantas **(Hocking et al., 1997; Ae et al., 1991; McLaughlin, 1991)**.
- Representa una fuente económica de proteína vegetal (entre 20% y 30%), constituyendo una alternativa para contribuir a conformar una dieta balanceada para el agricultor y la comunidad en general **(Colina et al., 2008)**.

3.11 Cuantificación de la fijación biológica de N₂ mediante el uso de ¹⁵N

A fin de asegurar un manejo apropiado y aprovechar plenamente los beneficios de la simbiosis leguminosa – rizobios es necesario medir la cantidad de nitrógeno fijado. El uso de isótopos para medir la FBN, ofrece cuantificaciones directas y permiten distinguir la proporción de N en la planta que procede del suelo (%N pd suelo), de un fertilizante (%N pd Fert) o de la atmósfera (%N pd Fij) y dar unos valores de FBN integrados para todo un ciclo de crecimiento de un sistema leguminosa-rizobios dado (**Hardarson, 1991; IAEA, 1995**).

El nitrógeno es un elemento químico constituido por 6 isótopos, de los cuales sólo el ¹⁴N y ¹⁵N son estables. La utilización de ¹⁵N como trazador se basa en la presencia en la naturaleza de ¹⁴N y ¹⁵N en una relación casi constante de 272 +/- 0,3 a 1, lo que arroja un 0.3663 +/- 0,0004 átomos % de exceso de ¹⁵N (**Axmann y Zapata, 1990**).

A partir de este valor prácticamente constante en la relación ¹⁵N/¹⁴N del medio natural, se ha desarrollado una metodología basada en los siguientes conceptos; la cantidad de ¹⁵N en una muestra de suelo se expresa como % átomos en exceso de ¹⁵N (% ¹⁵ N a.e) con respecto al valor de la abundancia natural de 0.3663 de nitrógeno atmosférico. Si se le suministra a una planta un producto que tenga un exceso atómico de ¹⁵N (% de ¹⁵N por encima de los 0.366 % de abundancia natural), la composición isotópica de N que esa planta acumule denotará un incremento en la proporción ¹⁵N/¹⁴N. Cuanto más alto es el exceso atómico en %¹⁵N en la planta, mayor ha sido la captación relativa de N procedente del producto marcado. Por el contrario, un descenso relativo en la relación ¹⁵N/¹⁴N en la planta suministrada del producto marcado, indica un incremento en la captación de N a partir de fuentes no marcadas (el N atmosférico) (**Barea et al., 1991**).

Es importante la aplicación de la técnica del ^{15}N en estudios como el que se plantea acá, en que requerimos medir la efectividad de microorganismos fijadores de N_2 como el rizobio en conjunto con la micorriza arbuscular sobre la productividad de los cultivos. Su aplicación en los experimentos como los planteados nos permitirá discriminar la eficiencia de fijación del N_2 de un *rizobio* nativo de los suelos ácidos de sabanas del estado Guárico en diferentes tratamientos que combinan el uso o no de la micorriza arbuscular y diferentes abonos verdes. Nos permitirá realizar recomendaciones sobre los mejores abonos verdes aplicados en conjunto con los inoculantes para un adecuado manejo del sistema agrícola.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Descripción del suelo utilizado

Se utilizó un suelo de sabanas, clasificado como Typic Paleustults. Geográficamente se ubica en las coordenadas 8° 33' 59" N y los 66° 05' 10" W, en la localidad de Espino, estado Guárico. Las condiciones climáticas de la zona se caracterizan por una precipitación promedio entre los rangos 1000 y 1150 mm, de 5 a 6 meses, con una temperatura promedio de 28°C y un piso altitudinal de 250 m.s.n.m, que corresponde a un paisaje de altiplanicie.

Con el suelo proveniente del agroecosistema descrito anteriormente y colectado en los primeros 20 cm., se realizaron experimentos en el invernadero del Instituto Nacional de Investigaciones agrícolas (INIA- CENIAP), Maracay estado Aragua; las condiciones climáticas del invernadero se controlaron con cortinas de agua, donde la humedad relativa promedio es de 70%, y la temperatura promedio diaria es de 36° C en el día. Y presentó las siguientes características:

Cuadro 1: Características del suelo utilizado en microcosmo para el cultivo de *Cajanus cajan*

Suelo	Textura	Fòsforo (mg.kg ⁻¹)	Potasio (mg.kg ⁻¹)	Calcio (mg.kg ⁻¹)	Mg (mg.kg ⁻¹)	MO (%)	pH (1:2.5)
Espino 0-20 cm	aF	7	37	113	28	1.02	5.23

--	--	--	--	--	--	--	--

Los atributos del suelo utilizado refleja cierto grado de acidez, y una baja fertilidad natural y obedece a un criterio característico de los suelos de sabana Venezolanos.

V .FASE EXPERIMENTAL I: ESTABLECIMIENTO DE LOS ABONOS VERDES EN ENSAYOS DE MICROCOSMOS EN INVERNADERO

5.1 Preparación del suelo

El ensayo se realizó en microcosmos (simulación con la condición natural microbiológica), que contenían 2 Kg de suelo proveniente de la localidad de Espino. El suelo fue pasado por un tamiz de 2 mm, para retirar los fragmentos gruesos de materia orgánica u otros restos. Las condiciones de humedad fueron controladas por diferencia de peso, con la aplicación de una lámina de agua calculada en función de la curva característica de retención de humedad de dicho suelo, de acuerdo con la capacidad de campo (1/3 kPa a 10 kPa y en aquellos tratamientos donde el suelo se esterilizó, se hizo a través el método de vapor fluente sometiendo el suelo al vapor producido por el autoclave durante 1 hora, por tres días, con 24 horas de separación **(Barea et al., 2002)**.

5.2 Siembra de abonos verdes

El diseño experimental utilizado se correspondió con un arreglo completamente aleatorizado con repeticiones en el tiempo, con diez repeticiones. Se utilizaron residuos provenientes de 2 leguminosas, una introducida *Crotalaria juncea* (RC) y una que crece naturalmente en la zona, *Indigofera lezpedizioides* (RA), además de una gramínea, *Sorghum bicolor* (RS). Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

SR= Sin residuos, Testigo

RS= Residuo de sorgo

RC= Residuo de crotalaria

RA= Residuo de añil

Las plantas se dejaron crecer hasta el momento de la floración (aproximadamente 45 días). En ese momento fueron cosechadas a nivel de la superficie. Se pesó toda la biomasa aérea (materia fresca) y luego ésta se cortó en trozos de aproximadamente 1 a 2 cm que se incorporaron al suelo en el microcosmos a una profundidad de 2 o 3 cm, para simular la práctica del campo relacionada con los residuos de cosecha. Una vez incorporados se dejaron en incubación por un período de 30 días según el procedimiento de **Rivero, 1993 y 1997**. Durante este tiempo se tomaron muestras de 1 g de suelo de cada tratamiento a intervalos de tiempo preestablecidos: 3, 6, 9,15, 22 y 29 días, con la finalidad de cuantificar el nitrógeno mineral (NO_3 y NH_4^+) (**Bradstreet, 1965**) y el Fósforo disponible (**Murphy y Riley, 1962**). Se realizaron estimaciones de la velocidad de mineralización de los abonos verdes, así como del aporte de N y P al suelo por las leguminosas utilizada.

Luego de 7 días, al finalizar la etapa de mineralización medida hasta el día 29, se sembró el quinchoncho (*Cajanun cajan*) var. Aroita en los microcosmos, inoculando con rizobios y hongos Glomeromycota nativos por separado o de manera conjunta según los tratamientos que se describen seguidamente. Se incluyó un tratamiento con suelo estéril (autoclavado) e inoculación de ambos microorganismos, para contrastar con la condición de suelo natural de los microcosmos con los residuos orgánicos (según se explica en el Cuadro 1). De esta manera se pretendió observar el comportamiento de los microorganismos inoculados sin la competencia de la microbiota nativa presente en los demás tratamientos, y constatar su eficiencia como inoculantes

Con el fin de estimar la velocidad de liberación del nitrógeno y fósforo de los diferentes tipos de abonos verdes utilizados, y analizar si el tiempo afecta la respuesta de los diferentes tratamientos, se realizó el análisis de los experimentos individuales en cada uno de los intervalos de tiempos utilizados. Para ello se procedió a correr los datos en el paquete estadístico SAS versión 11.0, para lo cual fue necesario primeramente realizar el análisis de la varianza.

VI. FASE EXPERIMENTAL II: CARACTERIZACIÓN Y AISLAMIENTOS DE LOS MICROORGANISMOS SIMBIOTES

Mientras se desarrollaba la primera fase experimental en la que se procedió a la siembra simultánea y posterior incorporación al suelo de los abonos verdes, se realizó de forma paralela la caracterización y aislamiento de los microorganismos simbiotes, rizobio y hongos Glomeromycota nativos, para lo cual se procedió de la siguiente forma:

6.1 Establecimiento de Macetas trampas para la obtención de inóculos de hongos Glomeromycota, formadores de la micorrizas arbuscular.

Se procedió a sembrar la planta indicadora *Sorghum bicolor* L. en microcosmos que contenían 2 kg de suelo experimental, se mantuvo por un periodo de 16 semanas, tiempo en el cual se produjo la colonización biotrófica de las raíces con el hongo micorrizas arbusculares, la proliferación de sus esporas y micelio (**Morton, 1988**). Estos tres propágulos constituyeron la fuente de colonización de las raíces por la micorriza y conformaron el inóculo de estos hongos utilizados en el ensayo de microcosmos.

6.2 Tinción de raíces micorrizadas

La tinción de las raíces se realizó según el método de **Phillips y Hayman (1970)**. En este método se separaron las raíces del suelo y se lavaron con agua corriente y se colocó una porción de 1 g aproximadamente en tubos de ensayo. Para un mejor manejo y observación las raíces éstas deben cortarse con una tijera en segmentos de 1,0 a 1,5 cm de longitud. Se tomó una porción de raíces, se añadió KOH al 10% y se procedió a hervir la preparación en baño de María durante 30 minutos. Luego se retiró el KOH y se lavaron las raíces con agua corriente. Seguidamente se sumergen en HCl 0,1 M por espacio de 5 a 10 minutos, se retira el ácido y se añade el colorante azul de tripán (0.05 % diluido en ácido láctico), se hierve nuevamente la preparación durante 30 minutos más. Finalmente el exceso de colorante se retira y para realizar la lectura de inmediato en el microscopio estereoscópico ó las raíces se dejan inmersas en ácido láctico diluido (20%) hasta el momento de la lectura.

6.3 Cuantificación del inóculo a través de la colonización de la raíz y el número de esporas en el suelo.

Se realizó la cuantificación mediante la metodología de Giovannetti y Mosse (1980) según ésta, se marca una caja de Petri con una red de líneas verticales y horizontales a una distancia de 1,0 cm de forma que se obtengan cuadrados de 1,0 cm de lado. Se toma una porción de raíces teñidas y se distribuyen al azar sobre la cuadrícula. Deben contarse todas las intersecciones de las raíces con todas las líneas verticales y horizontales, y anotar si el punto de la intersección hay colonización o no. Se obtienen dos valores, número de intersecciones de raíz colonizada y el número total de intersecciones (colonizadas y no colonizadas). Se calcula el % de Longitud de Raíz Colonizada (%LRC) según la siguiente fórmula:

$$LRC = \frac{N^{\circ} \text{ de intersec tos de raíz colonizada s}}{N^{\circ} \text{ de intersec tos totales (con y sin colonizaci ón)}} * 100$$

6.4 Separación de las esporas de MA del suelo

Se hizo la separación de esporas de los hongos Glomales con el método de Gerdemann y Nicolson, (1963) a partir de muestras de suelo tomadas una vez que se han propagado especies en macetas trampa (4 a 6 meses) Este método consistió en tomar 50 g de suelo húmedo (Paralelamente se toma una muestra aparte de ese mismo suelo y se le determina peso seco a 105°C) y colocarlo en un vaso precipitado de 1000 mL, se agregó agua y agita con una varilla de vidrio durante 30 segundos, luego se dejó reposar de 10 a 20 segundos y se decanta el sobrenadante a través de una serie de tamices con abertura de malla de 500, 250 y 45 μm (repetir la operación mínimo 5 veces) seguidamente se recoge con un poco de agua el suelo de los tamices de 250 y 45 μm en tubos de centrifuga, al cual se le agregó 20 mL de agua y se centrifugo a 3500 rpm por 5 minutos.

A continuación se retiro el sobrenadante y se removió el pellet del fondo del tubo y se añadió un gradiente de sacarosa (20 y 60%) y se procedió a centrifugar nuevamente durante 3 minutos a 3500 r.p.m.

Finalmente se elimino el exceso de sacarosa con agua destilada y se vació el tamizado a capsulas de petri, para su observación y conteo

6.5 Valoración del Inóculo con hongos formadores de micorrizas arbusculares para el cultivo indicador *Cajanun cajan*:

Los hongos micorrízicos utilizados en esta investigación fueron reproducidos en suelos provenientes de la localidad de Espino, usando como planta hospedera el sorgo. Para los ensayos de invernadero se utilizó un inóculo que consistía en fragmentos de raíz y suelo con un 67% de longitud de raíz colonizada, 42 esporas por gramo de suelo, una cantidad considerable de micelio y esporocarpos.

En términos generales el número de esporas por gramo se encuentra en valores normales si se toman en cuenta los datos reportados por Collins *et al.* (1991) quienes encontraron entre 0 y 49 esporas en 25 gramos de suelo en un experimento en el que se evaluaron poblaciones de MA asociadas con cultivos de maíz y soya de cinco años. Además **Howeler et al., (1987)** registraron conteos de esporas nativas asociadas a *Brachiaria decumbens*, que no superan las 10 esporas por gramo de suelo. Igualmente **Douds et al., (1995)** encontraron entre 1 y 43 esporas por 50 gramos de suelo en cultivos de maíz, soya y trigo en sistemas de labranza convencional y minina. Por su parte **Serralde et al., (2004)** reportaron de 4 a 18 esporas por gramos de suelo en unos experimentos realizados utilizando dos variedades de maíz bajo distintos tratamientos con abono orgánico (gallinaza), abono verde (Caupí). Por lo general, los inóculos de MA contienen una mayor cantidad de esporas que en los casos citados anteriormente, donde se realizaron valoraciones del número de esporas en condiciones de campo, afectadas por diferentes manejos. La comparación realizada nos permite ilustrar que en nuestro trabajo utilizamos como inóculo una fuente de propágulos más rica de lo que puede encontrarse de forma natural en el suelo.

6.6. Obtención de Rizobios a partir de nódulos de *Cajanus cajans*

A través de la metodología de macetas trampa se obtuvo los rizobios, esta prueba se desarrolló en la casa de cultivo del Instituto de zoología tropical de la facultad de Ciencias

UCV, este procedimiento consistió en sembrar las semillas de la fabácea (*Cajanus cajan*) en microcosmos que estaban constituidos por 2 kg de suelo de la localidad de Espino Edo Guarico; para aislar los rizobios nativos, las plantas se dejaron en desarrollo por un periodo de 12 semanas, tiempo requerido para la formación de nódulos.

6.7 Aislamientos de rizobios a partir de nódulos

Las cepas de rizobio se obtuvieron de los nódulos de *Cajanus cajan*. En primer lugar fue necesario la cosechar las plantas, luego de 12 semanas para lo cual se procedió a colectar las raíces de *Cajanus cajan*, y luego éstas fueron lavadas con agua corriente, con la precaución de no dañar sus estructuras.

El procedimiento de la extracción de nódulos se realizó en campana de flujo laminar, para garantizar las condiciones de esterilidad, de allí se procedió a aislar los rizobios colectados de las raíces de *Cajanus cajans*. Para ello se hidrataron los nódulos en solución salina estéril, y se lavaron cuidadosamente con agua destilada estéril varias veces para eliminar restos de suelo e impurezas. Posteriormente fueron esterilizados superficialmente por 5 minutos con hipoclorito al 4% según Vincent, 1970; CIAT, 1988 y lavados con abundante agua destilada estéril.

Los nódulos fueron macerados en placa de Petri utilizando una varilla de vidrio estéril; el jugo del nódulo obtenido se sembró por agotamiento en placas con medio YEM-r (extracto de levadura manitol y rojo congo), utilizando un asa de níquel según técnicas clásicas de Microbiología (CIAT, 1988). La composición del medio de cultivo YEM-r por litro es: K_2HPO_4 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g; NaCl 0.2g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.01g; $CaCl_2$ 0.15g; manitol 10g; agar Difco 15g; 10ml de rojo congo. Este medio es selectivo para identificación de colonias

de rizobio (Vincent, 1970). La siembra se realizó en placas por triplicado para cada macerado y se colocaron en incubadora a temperatura constante (28 °C) hasta observarse el crecimiento de las colonias. En ese momento, se observaron visualmente las características fenotípicas de las colonias y se aislaron por separado. Las colonias fueron elegidas en base a su fenotipo, circulares, semi-traslúcidas, convexas de bordes regulares, de color lechoso y mucilaginoso en su mayoría con abundante gomosidad, características de las cepas de rizobios. Se realizaron sucesivas siembras en medio de cultivo sólido hasta la obtención de aislamientos puros.

De igual forma se utilizó el medio YEM-a (extracto de levadura manitol y azul de bromotimol) al que se le añadió 5 ml al 0.5 % de azul de bromotimol, indicador que permite diferenciar exudados ácidos o alcalinos en las bacterias colectadas lo que nos indica una diferencia entre los aislados por cambio de pH en el medio.

Se colocaron a crecer los rizobios en medio líquido, para determinar la densidad óptica (DO) a 400 nm, durante intervalos de tiempo de 6 horas. Y cada intervalo se tomó alícuota para medir número de colonias por dilución en placas, así hasta completar 72 H, y luego se construyó la curva de crecimiento con los valores de DO y unidades formadoras de colonias/ml (ufm/mL)

Estos rizobios aislados fueron analizados por otras pruebas complementaria realizadas por **Madrid, (2007)** mediante la determinación de la eficiencia simbiótica y características fisiológicas y bioquímicas de rizobios asociados a leguminosas en suelos de sabanas del edo. Guárico, Venezuela

Los rizobios aislados a partir del cultivo indicador *Cajanus cajan* se colocaron a crecer en medio líquido extracto de manitol en agitación, para promover la aireación del medio,

hasta obtener una población aproximada de 10^9 bacterias por mL. Las plantas se inocularon a 5 días después de la germinación añadiendo 1 mL del inoculante preparado cerca de la raíz de la planta.

7. APLICACIÓN DE LAS ENMIENDAS QUÍMICAS, DOSIS Y FUENTES

Se utilizaron las siguientes dosis de fertilizantes: 15 kg de N.ha⁻¹, en forma de sulfato de amonio. 100 kg de P.ha⁻¹, en forma de roca fosfórica Riecito (**37% de CaCO₃, 26% de P₂O₅**), las cuales se aplicaron 2 días antes de la siembra del cultivo indicador, *Cajanus cajan*, mezclándolas con el suelo manualmente.

7.1 Dosis aplicada de fertilizante marcado con ¹⁵N

Con la finalidad de estimar la FBN de N₂ del cultivo indicador (*Cajanus cajan*) se utilizó el fertilizante nitrogenado (¹⁵NH₄)₂SO₄, La riqueza del producto utilizado fue de 10% átomos de ¹⁵N en exceso, en una concentración de 7.32 mg N¹⁵.microcosmo⁻¹ que corresponde a una dosis de 15 kg. ha⁻¹.

La aplicación de la dosis calculada del fertilizante nitrogenado se realizó, inmediatamente después de la emergencia de las plantas del cultivo indicador (**Barea et al., 2002**)

VIII. FASE EXPERIMENTAL IV: ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO INDICADOR

La planta indicadora utilizada en este ensayo fue el quinchoncho (*Cajanus cajan* L.). Dicho cultivo fue sembrado en microcosmos (macetas cuyo tamaño y condición natural se asemejan al agroecosistema de estudio después de la ejecución de las fases

experimentales previas se observa en el cuadro 2 los diversos tratamientos utilizados con sus repeticiones.

Cuadro 2: Tratamientos en el ensayo de microcosmos de plantas de *Cajanus cajan* en condiciones de invernadero para determinar la efectividad de los simbiontes (rizobios y MA) en presencia de abonos verdes

Variantes	SR	RS	RC	RA
SM	4	4	4	4
RH	4	4	4	4
MA	4	4	4	4
(RH + MA)	4	4	4	4
SE (RH + MA)	4	4	4	4

Descripción de la leyenda:

SR: Sin residuo

RS: RF con incorporación de residuos de sorgo.

RC: RF con la incorporación de residuos de crotalaria.

RA: RF con la incorporación de residuos de añil.

SM : sin inoculación de microorganismos

RH: Inoculado con la cepa de rizobios (Figura 1)

MA: Inoculado con el hongo micorrizas.

RH+ MA: Inoculaciones de rizobios y micorrizas

SE+ RH + MA: Suelo estéril con inoculaciones de rizobios y micorrizas

Cada tratamiento fue repetido 4 veces, lo que suma un total de 80 microcosmos a analizar. Es conveniente señalar que a todos los microcosmos se les aplicó fertilizantes marcado $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en dosis de 15 Kg. ha^{-1} .

Las plantas de *Cajanus cajan* se cosecharon 8 semanas (tiempo suficiente en que se habrían establecido los microorganismos simbiotes utilizados y se podía observar su efecto en la planta) después de la siembra, cortando las plantas a 1 cm del suelo con una tijera de poda. El follaje fue lavado con agua desmineralizada y colocado en bolsas de papel previamente identificadas con los tratamientos correspondientes, para posteriormente ser secadas en estufa de ventilación forzada a 70 °C durante 48 horas, hasta alcanzar peso constante.



Figura 1. Aplicación rizobios, en microcosmos a plantas de *C. cajans*

8.1 DETERMINACIONES REALIZADAS A LA PLANTA

Una vez secado el material vegetal correspondiente a la biomasa aérea, se pesó para la determinación de la biomasa aérea y posteriormente fue molido para las determinaciones químicas.

8.2 Análisis químicos realizados:

- Se determinaron Nitrógeno inorgánico (**Kjeldahl, 1965**) y Fósforo disponible en suelo (**Murphy y Riley, 1962**)
- Se determinó Nitrógeno total en tejido foliar (**Bradstreet, 1965**)
- El nitrógeno marcado ^{15}N se determinó por espectrometría de emisión en el NOI6, del Instituto Nacional de Investigaciones agrícolas del INIA-UNILAB, Maracay Edo Aragua.

Para conocer la eficiencia en la fijación de N_2 de los tratamientos con inoculos microbianos utilizados, se calculó la razón o actividad específica del N, a partir de los contenidos de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Dicha actividad fue expresada como **% exceso de átomos de ^{15}N** . Se realizó una comparación relativa de las cantidades fijadas de N_2 , a partir de la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en cada tratamiento. Este valor permitió conocer la eficiencia de la FBN realizada por la cepa de rizobio inoculada, y si dicha eficiencia se ve afectada por los tratamientos con abonos verdes y la interacción con micorrizas arbusculares. Menores valores de la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ corresponden a mayores cantidades de N_2 fijado biológicamente.

8.3 Determinación de las características morfológicas de la raíz

Las raíces se separaron del suelo y se lavaron con agua corriente a través de tamices de 2,1 y 0,5 mm de diámetro para evitar pérdidas del material. Fueron separadas en dos porciones iguales: las muestras que se utilizaron para determinar la longitud radical y las de colonización radical por MA. Ambas porciones se colocaron por separado en bolsas de polietileno identificadas previamente, para luego ser refrigeradas a 12°C hasta su procesamiento.

8.4 Porcentaje de longitud de raíz colonizada por micorrizas arbusculares

Se procedió a lavar las raíces con agua corriente a través de un tamiz de 0,5 mm y posteriormente fueron teñidas con azul de tripán de acuerdo con la metodología de **Phillips y Hayman (1970)**. Una vez teñidas las raíces, estas son observadas con una lupa estereoscópica para determinar el porcentaje de colonización utilizando el método del intercepto, según **Giovannetti y Mosse (1980)**.

8.5 Cuantificación y peso de nódulos

Se separaron cuidadosamente los nódulos de las raíces después de contarlos y se pesaron en balanza analítica para determinar el peso fresco total de nódulos/planta en cada tratamiento.

8.6 Longitud radical

Las muestras de raíces fueron teñidas con safranina al 0,5% para determinar la longitud radical por el método de **Tennant (1975)**. Para ello se utilizó un recipiente de vidrio de 25 x 25 cm y 2 cm de grosor; debajo de éste se colocó una cuadrícula de 1 x 1 cm, las raíces se cortaron en fragmentos de 1 cm de longitud y fueron distribuidas al azar dentro del recipiente de vidrio.

Se procedió a contar las intercepciones de las raíces con las líneas horizontales y verticales que forman la cuadrícula. Los cálculos se realizaron de la siguiente forma:

$$LR = 11/14 \times N \times UC$$

LR: longitud radical

UC: unidad de la cuadrícula (1 cm)

N: número de intersecciones entre raíces y líneas horizontales y verticales

X. Análisis estadístico aplicado a los datos

En este ensayo se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial de tratamientos. A continuación se presenta el cuadro 3 los diversos tratamientos utilizados.

Cuadro 3. Ordenamiento de los tratamientos utilizados en el ensayo de microcosmos de plantas de *Cajanus cajan* en condiciones de invernadero para determinar la efectividad de los simbioses (rizobios y MA) en presencia de abonos verdes.

Tratamientos		SR	RS	RC	RA
		b₀	b₁	b₂	b₃
a₀	SM	4	4	4	4
a₁	Rh	4	4	4	4
a₂	MA	4	4	4	4
a₃	Rh+ MA)	4	4	4	4
a₄	Rh+MA+ SE	4	4	4	4

A: Inoculación microbiana (rizobios y Micorrizas).

B: Fertilización combinada (roca fosfórica, residuos sorgo, residuos crotalaria, residuos añil)

t: Nº de tratamientos = 20

r: Nº de repeticiones = 4

a: Nº de niveles del factor A = 5

b: Nº de niveles del factor B = 4

Total de observaciones $abr = 80$

XI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11. 1 Efecto de los residuos vegetales incorporados para la variable Nitrógeno inorgánico y fósforo disponible en suelo.

Los resultados obtenidos del análisis de la Varianza para datos de nitrógeno en suelo en cada uno de los intervalos 3, 6, 9, 15, 22 y 29 días de tiempo resumen en forma general, el efecto de los abonos verdes utilizados: Sin residuo (SR), residuo de sorgo (RS), residuo de crotalaria (RC) y residuo de añil (RA) en el tiempo. Para los tiempos 3, 6, 9 y 15 días ($p < 0.01$) se obtienen valores altamente significativos, sin embargo en los tiempos 22 y 29 días no se observaron diferencias significativas, lo cual refleja que la incorporación de los RS, RC y RA, provocó variación en las cantidades de nitrógeno inorgánico (NH_4^+ y NO_3^-), durante el tiempo de incubación y cuyas cantidades se ilustran en la **figura 2**.

Los valores de nitrógeno inorgánico determinados en esta evaluación fluctuaron en cantidades de 75 a 149 mg/kg de suelo, para el día 3 inicio de la primera medición se observa que estadísticamente fue diferente RS en contraste con SR, SC y RA que no tuvieron ninguna variación según se aprecia en la figura 1. Y en los días 6, 10, 14 reflejan tendencias diferentes desde el punto de vista estadístico y en especial en la medición del día 14 resalta el tratamiento RA con el pico más alto de la curva y ya en las últimas dos mediciones correspondientes a los días 22 y 29 no se presentó diferencia estadística alguna, reflejando una tendencia que varía de 85,20 mg/kg de N (SR), 82,60 mg/kg de N (RS) y 89,60 mg/kg de N (RC), lo cual no permite predecir el comportamiento de la curva en la siguiente fase experimental.

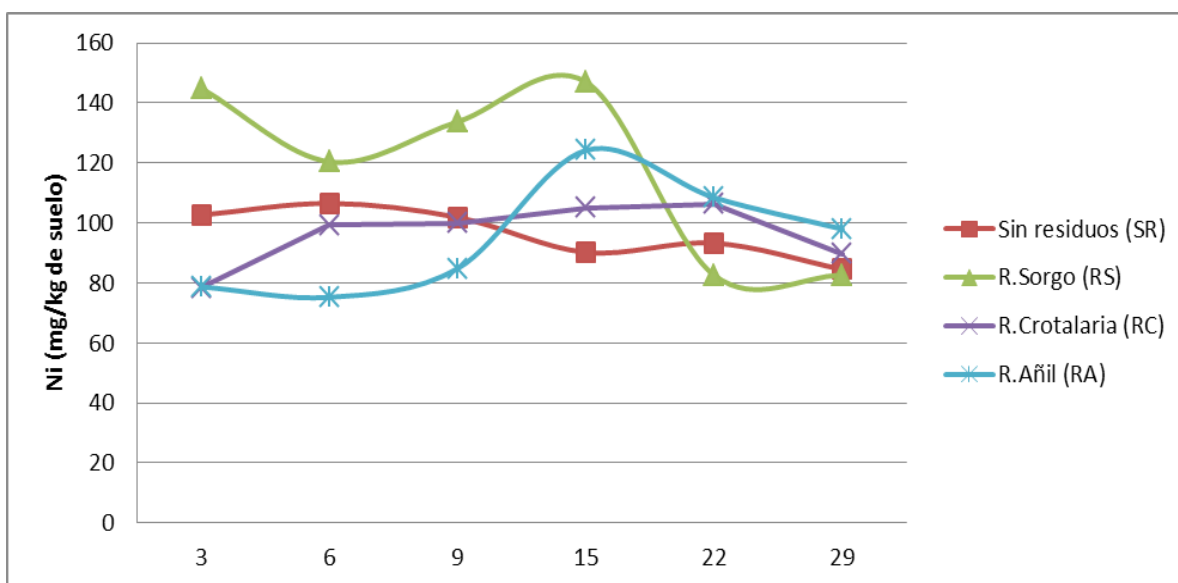


Figura 2. Liberación de nitrógeno de los tratamientos utilizados como residuos vegetales de sorgo (*Sorghum bicolor*), crotalaria (*Crotalaria juncea*) y añil (*Indigofera lespedizoides*)

De allí se desprende que la incorporación de residuos orgánicos, ha sido utilizada ampliamente como un práctica de manejo de suelos que permite mejorar sus características físicas, químicas y biológicas (Aciego et al., 1995) , sin embargo es necesario conocer a profundidad la dinámica de los procesos de mineralización por que representan las bases fundamentales cuando se estudian los sistemas suelo-planta-microorganismos, estos procesos con altamente complejos, especialmente cuando son combinados con aplicaciones de inoculantes a bases de rizobios.

Los resultados se esta investigación están relacionados con las cantidades de nitrógeno en los distintos días de evaluación, y reflejan que RS, RC, y RA no presentaron variaciones significativas en comparación con el SR, es decir que en teoría los aportes de N al suelo

por parte de los abono verdes (AV) no tuvieron efectos marcados. En tal sentido López et al. (2006), en condiciones de campo evaluó los mismo tratamientos de (AV) y determino los contenidos de lignina, celulosa, carbono y nitrógeno, los cuales son tomados como referencia para explicar los valores de N y P en esta trabajo.

Las especies leguminosas Añil y *Crotalaria* presentan relaciones C/N bajas y en sorgo esta relación es alta, esta condición activa los procesos de mineralización o inmovilización de Nitrógeno orgánico (Norg) a través de la masa microbiana y en la medida que actué un mecanismo u otro va a depender las disponibilidad del N inorgánico.

En este caso el suelo presenta bajo contenido de Materia orgánica (MO) 1.02%, en este sentido suponemos que la masa microbiana utilizo las sustancias orgánicas carbonadas como fuente de energía, procedente de los Residuos incorporados, de allí que el N quedo atrapado en los tejidos de la población microbiana presente. En promedio se aplicaron 7.900 kg.ha^{-1} RC, 8.820 kg.ha^{-1} RA y $12.500 \text{ kg.ha}^{-1}$ RS

En un trabajo estos autores Fernández y Ortega 2010, en condiciones de campo evaluaron el efecto de la edad de incorporación de *Crotalaria Juncea* y *Vigna radiata* a los 25, 35 y 45 días, sobre algunas las propiedades físicas y químicas de un suelo y la mayoría de las características evaluadas mejoran con el uso de abonos verdes y en a medida que aumenta la edad de incorporación.

Ruiz et al., 2008 en condiciones controladas por la metodología de incubación encontraron que residuos de *Crotalaria* y sorgo en combinación con fertilizantes inorgánicos en diferentes dosis, producen un efecto favorable en la biomasa microbiana que se evidencio mediante la determinación de carbono y nitrógeno microbiano,

reflejando un efecto positivo en la combinación de *Crotalaria*+sorgo+fertilizante sobre los valores de carbono microbiano y Nitrógeno microbiano

En condiciones de campo **Aciego et al., 1995** utilizando diferentes tratamientos de coberturas que incluían tratamientos de barbecho y *Crotalaria* incorporados Vs Cobertura sobre la dinámica de las poblaciones microbianas de bacterias, hongos, celulíticos, y de allí la incorporación de los materiales presenta el mayor efecto sobre las poblaciones microbianas y sobre las variables físicas y químicas del suelo estudiado, de esto se desprende que los rizobios viven en el suelo normalmente como organismos descomponedores usando compuestos orgánicos simples de N y que esta característica debe ser tomada en cuenta posteriormente en esta investigación (Froni 2011)

Por otra parte Muraoka et al. (2001) evaluó el efecto de las especies *Crotalaria juncea* y *Mucuna aterrim* en suelos de Brasil, usadas como abonos verdes para suplir de N al cultivo del arroz y encontró que La mucuna, produce más materia seca y contiene más nitrógeno, proporcionando hasta 362 kg N ha⁻¹, más del doble que *crotalaria* (149 kg N ha⁻¹). El nitrógeno de *crotalaria*, parece ser más fácilmente disponible, pues las contribuciones de ambas en término de contenido del nitrógeno fue igual. Los abonos verdes proporcionaron mejor uso del nitrógeno del fertilizante (“efecto priming”), sobre todo en la aplicación de cobertura, favoreciendo una eficiencia de hasta 79%.

La mayoría de las investigaciones relacionadas con la incorporación de abonos verdes al suelo representan una actividad común en zonas agrícolas de interés en las cuales hacen aportes de N al suelo que luego son aprovechados por el cultivo siguiente, sin embargo es necesario estudiar los efectos relacionados con la aplicación de inoculantes microbianos como la eficiencia de rizobios en los procesos de FBN, que se serán estudiados posteriormente.

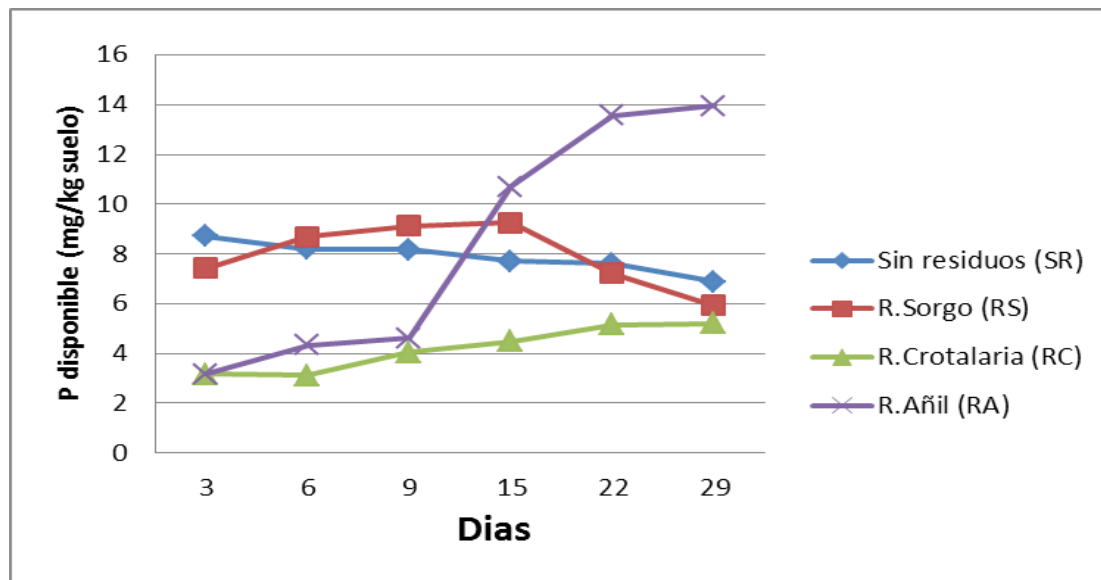


Figura 3. Liberación de fósforo de los tratamientos utilizados como residuos vegetales de sorgo (*Sorghum bicolor*), crotalaria (*Crotalaria juncea*) y añil (*Indigofera lespedizoides*)

En el caso del fósforo disponible se obtiene que para todos los intervalos de tiempo existen diferencias altamente significativas ($p < 0.01$). La incorporación de los residuos de sorgo, crotalaria y añil, provocó variación en los niveles de fósforo, cuyas cantidades se ilustran en la **figura 2**.

El contenido más alto de P disponible (13.93 mg/kg) lo presentó el tratamiento RA para el tiempo ultimo tiempo de la medición día 27, sin embargo existe una tendencia a incrementarse en el tiempo, lo cual beneficiaría la siembra del cultivo de Quinchoncho a lo largo del experimento.

Este resultado semejan lo reportado por **Lehmann (2001)**, quien encontró un notable mejoramiento en la disponibilidad de P en oxisoles de la Amazonía central cuando se incorporaron residuos de *Indigosphaera constricta*, pariente cercano del añil (*Indigosfera lespedizoides*). Igualmente, la plantación de árboles o arbustos de distintas especies, entre ellas de *Indigosphaera constricta*, incrementó las cantidades de carbono, nitrógeno y fósforo en un suelo arenoso en Colombia (**Phiri et al., 2001**).

Los RC son los que menos aportan al suelo en lo que se refiere al P, y sus niveles son muy bajos en todas las evaluaciones. También en este caso estos resultados corroboran los obtenidos por **Bünemann et al. (2004)** en suelos de Kenya, los cuales encontraron que en rotación crotalaria- maíz se lograron altos niveles de materia orgánica y nutrientes en el suelo, aunque no ocurrió lo mismo en las concentraciones de P disponible.

De acuerdo con todo lo expresado, los resultados expuestos en las figuras 1 y 2 ponen en evidencia que existe un liberación de P y N procedentes de los residuos vegetales al suelo y podría ser utilizada como una vía para mejorar la cantidad de nutrimentos utilizables en la producción agrícola, puesto que algunas especies vegetales que no tienen uso específico agrícola pueden convertir formas poco lábiles de elementos nutritivos en otras formas utilizables por los cultivos económicos (**Nziguheba et al., 2000; Grierson et al., 2004**).

En lo que se refiere a la degradación de las enmiendas orgánicas tales como residuos vegetales, compost o estiércol, puede decirse que los residuos que contienen poco fósforo se descomponen lentamente y el elemento es retenido casi completamente dentro de las células microbianas en el suelo, mientras que los residuos ricos en fósforo se

descomponen rápidamente y gran parte del elemento es liberado en la solución del suelo, la cual es tomada por las plantas (**Kwabiah, 2003; Búnemann et al, 2004**)

Esta investigación hace referencia a los resultados obtenidos por **López et al. (2006)**, donde se determinó la relación carbono/fósforo para los RS (114), RC (350) y RA (550), en condiciones de campo, y en nuestro caso pudiera estar relacionado con el comportamiento de las curvas de P en los diferentes tratamientos, ya que después de la incorporación de los RS inmediatamente a los 3 días se inicia la liberación de dicho elemento, mientras que para los RA la liberación del fósforo comienza en la cuarta evaluación que corresponde al día 14

Es posible que en el suelo analizado en condición invernadero, necesite un período de tiempo mayor para que se manifiesten diferencias en la aplicación de residuos, también el manejo del suelo al trasladarlo del campo al invernadero, podría haber enmascarado eventuales diferencias entre los residuos a las que se manifiestan en condiciones de campo (**López 2011 y Videla et al., 2005**).

Nuestros resultados deben ser profundizados en futuras investigaciones y escalados, para lograr la aplicabilidad de los beneficios que se han esbozado, en forma preliminar, en cuanto a la posibilidad de sincronizar la descomposición de los residuos vegetales que mejor se comporten en los distintos suelos y regiones del país con los momentos de siembra y con las distintas etapas del desarrollo de los cultivos y de aplicación de microorganismos como el caso de rizobios.

11.2 Desarrollo de plantas de quinchoncho (*Cajanun cajan*) cultivadas en presencia de los residuos e inoculadas con rizobios *sp* y micorrizas arbusculares.

En los cuadros del 2 al 7 se muestran los resultados obtenidos en la segunda fase de esta investigación que consistió en la siembra de la fabácea *Cajanus cajan* con las diferentes combinaciones de tratamientos de abonos verdes asociados a la aplicación de inóculos de rizobios y hongos micorrízicos del suelo y que fueron evaluadas en condiciones de invernadero.

En el cuadro 4 se ofrecen los resultados obtenidos en las evaluaciones de la materia seca del *Cajanus cajan* en los distintos tratamientos biológicos: sin inoculación (**SM**), rizobios (**RH**), Micorrizas (**MA**), rizobios + Micorrizas (**RH+MA**) y rizobios+ Micorrizas + Suelo estéril (**RH+MA+E**). De esto observamos SM presenta los valores de materia seca (g) por debajo de los demás tratamientos relacionados con la Inoculación de rizobios y micorrizas. Aquí se evidencia un efecto positivo sobre el crecimiento del quinchoncho.

Cuadro 4. Materia seca de *Cajanus cajan* (g) desarrollado durante 8 semanas con sus respectivas combinaciones de tratamientos.

Tratamientos	Sin residuo (SR)	Residuo de Sorgo (RS)	Residuos de Crotalaria (RC)	Residuos de añil (RA)
Sin inoculación (SM)	1.130 a	0.872 a	1.077 a	1.098 a
Rizobios (RH)	1.284 a	1.310 a	1.411 ab	1.687 ab
Micorrizas (MA)	1.378 ab	1.440 ab	1.237 a	1.535 ab
Rizobios + Micorrizas (RH+MA)	1.464 ab	1.647 ab	1.703 ab	1.234 a
Rizobios + Micorrizas+ SE RH+MA+SE	1.467 ab	2.163 ab	1.587 ab	1.280 a

Los datos son el promedio de cuatro replicas por tratamiento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En un ensayo de suelos de sabanas desarrollado en Huimanguillo México, **Cordova-Sánchez et al., 2011**, evaluaron el efecto de *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis* y *Mucuna deerengiana*, en rotación y asociación con maíz utilizando el potencial de estas fabáceas para la FBN y encontraron que la fabácea *C. cajan* obtuvo el mayor Número y materia seca de nódulos en el sistema de rotación con maíz, en comparación del resto de las fabáceas y sistema de producción en asociación.

López et al., 2005 evaluó los aportes por FBN en rotación *Sorghum bicolor-Cajanus cajans* en un suelo ácido y encontró que *C.cajan* variedad **Aroita**, posee una alta capacidad para establecer los procesos de FBN y fue evidenciado por su altos rendimientos de materia seca.

Estos resultados indican la acción beneficiosa de los microorganismos respecto a sus hospedantes vasculares y por lo tanto de la simbiosis, que se refleja en el crecimiento y aumento de la biomasa de las plantas de quinchoncho. Ello se traducirá en una mayor supervivencia de la planta en el campo y en el incremento de la producción, constituyendo una alternativa útil en la agricultura sustentable debido a su uso potencial como inoculantes (**Cuenca et al., 2007**).

Cuadro 5. Contenido de P (mg P/g p seco) parte foliar de *Cajanus cajan* desarrollada durante 8 con los diferentes residuos y combinaciones de microorganismos.

Tratamientos	Sin residuo (SR)	Residuo de sorgo (RS)	Residuo de Crotalaria (RC)	Residuo de añil (RA)
Sin inoculación	0,11 <i>abc</i>	0,13 <i>abc</i>	0,09 <i>ab</i>	0,13 <i>abc</i>
Rhizobium sp	0,12 <i>abc</i>	0,11 <i>abc</i>	0,09 <i>a</i>	0,17 <i>bc</i>
Micorrizas	0,12 <i>abc</i>	0,15 <i>bc</i>	0,13 <i>abc</i>	0,16 <i>c</i>
Rizobios + micorrizas	0,11 <i>abc</i>	0,14 <i>abc</i>	0,17 <i>c</i>	0,17 <i>bc</i>
Rizobios+micorrizas en suelo estéril	0,14 <i>abc</i>	0,12 <i>abc</i>	0,14 <i>abc</i>	0,15 <i>bc</i>

*Los datos son el promedio de cuatro replicas por tratamiento. *Letras distintas indican diferencias significativas en la misma columna (p < 0.05)*

En este cuadro 5, a pesar de no presentarse diferencias estadísticas en las columnas de SR, RS y RC, se destaca la columna RA por presentar los valores más altos en la absorción de P por la planta, en donde se aplicó RH (0.17 mg/kg de P) y RH+MA con el mismo valor, sin embargo el segundo mejor valor el obtiene para el tratamiento solo con MA (0.16 mg/kg de P). Independientemente del análisis estadístico observamos una tendencia en general a obtener los mejores valores de las cantidades de de P en aquellos tratamientos donde se inocularon los microorganismos, resaltando la Inoculación mixta RH+MA, lo cual sugiere mayor efectividad de los mecanismos biológicos para la obtención de dicho elemento por parte de la planta.

Al respecto, **Walker (1981)** explica que el sistema enzimático y la distribución geométrica del micelio fúngico hace que la simbiosis con las raíces de las plantas sea más efectiva para la absorción de agua y nutrientes en especial el fósforo. La doble simbiosis, micorriza-rizobios contribuye a la captación tanto del P como del N (**Toro et al. 1998; Barea et al., 2002**). De esto pudiéramos explicar los mejores valores de P para los tratamientos de residuos de sorgo y crotalaria.

Asimismo, numerosas investigaciones en los últimos años han mostrado que los hongos micorrízicos pueden captar nutrientes del suelo y trasbocarlo a las raíces de las plantas asociadas **(Auge, 2001)**. En los suelos con escaso contenido de fósforo asimilable cuando las raíces fracasan en su intento por tomar el nutriente, las micorrizas operan extendiendo sus hifas externas desde la superficie de las raíces hasta las áreas del suelo en donde este elemento aún no se ha agotado **(Yao et al, 2001; George, 2000)**. Esto pudiera explicar los mayores contenidos de fósforo en el vástago de en todos los tratamientos con plantas micorrizadas, especialmente cuando están asociadas con rizobios, aunque con leves diferencias entre los tratamientos con las coberturas.

La aplicación conjunta co-inoculación de hongos micorrízicos con bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobios*, *Azospirillum* o *Azotobacter* ha mostrado generalmente resultados positivos, obteniéndose rendimientos superiores a los que se obtienen cuando se inoculan solamente las micorrizas, siempre que se tome en cuenta la apropiada especificidad del rizobios con la especie de leguminosa **(Toro et al., 1996)**. La co-inoculación puede generar relaciones positivas entre los microorganismos inoculados (bacteria-hongos Glomeromycota), sugiriendo que pueden existir mecanismos de sinergismo entre las bacterias aplicadas y la simbiosis micorrízica **(Barea y Azcón-Aguilar, 1983; Toro et al., 1997; Gryndler, 2000)**

También se ha puesto de manifiesto en los resultados que la inoculación de las MA y del RH, pudo haber estimulado, no solo de la biomasa del quinchoncho (cuadro 1), sino también el alargamiento de las raíces, lo cual permite beneficios al desarrollo de las plantas y la toma de nutrientes.

Cuadro 6. % exceso de átomos de ^{15}N de la parte foliar de *Cajanus cajan* desarrollado durante ocho semanas con los diferentes tratamientos de abonos verdes y combinaciones de microorganismos

Tratamientos	% exceso de átomos de ^{15}N			
	Sin residuo (SR)	Residuo de sorgo (RS)	Residuo de Crotalaria (RC)	Residuo de añil (RA)
Sin inoculación (SM)	1.196 c	0.187 a	0.166 a	0.170 a
Rizobios (RH)	0.154 a	0.195 abc	0.180 abc	0.178 a
Micorrizas (MA)	0.170 b	0.253abcd	0.210 abcd	0.190 abcd
Rizobios+micorrizas (RH+MA)	0.185 b	0.256 abcd	0.190 abc	0.184 abcd
Rizobios+micorrizas+SE (RH+MA+SE)	0.183 b	0.314 e	0.240 abcd	0.249 cde

*Los datos son el promedio de cuatro replicas por tratamiento. *Letras distintas indican diferencias significativas en la misma columna ($p < 0.05$)*

En el Cuadro 6, se muestra la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, expresada como % **exceso de átomos de ^{15}N** , en los tratamientos aplicados a las plantas de quinchoncho. La eficiencia en la fijación biológica se puede analizar mediante la comparación del cociente producto de la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en los tratamientos con las diferentes combinaciones de microorganismos inoculados.

A partir de dicha relación, se pudiera predecir la cantidad de nitrógeno fijado o de su eficiencia por el cultivo y esta metodología consiste en hacer comparaciones relativas de un valor denominado bajo o alto, es decir se presentan dos hipótesis; partiendo de las siguientes premisas; todo el ^{15}N proviene únicamente del fertilizante marcado agregado al suelo del experimento según la dosis requerida por el cultivo indicador, y todo el ^{14}N

proviene principalmente de tres fuentes suelo, atmósfera y residuos incorporados según las hipótesis que se presentan a continuación:

Hipótesis 1: $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ = Baja; presenta un denominador alto y hace referencia a la presencia de mayores cantidades del elemento ^{14}N , que pudieran reflejar que la planta a utilizado los mecanismos de fijación biológica para la captación de N.

Hipótesis 2: $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ = Alta; presenta un denominador bajo y hace referencia a la presencia de pequeñas cantidades del elemento ^{14}N , que pudiera reflejar que la planta prescindió de los mecanismos de fijación biológica al conseguir suficientes cantidades de N inorgánico para su nutrición (**Hardarson y Danso, 1990 y 1993**).

Los resultados plasmados en el cuadro 2 refleja que la columna sin residuos(SR) es decir en ausencia de coberturas, la inoculación con rizobios obtuvo el valor más bajo (0.154) siendo estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) en comparación a los demás tratamientos biológicos, seguido micorrizas (0,170) y micorrizas + rizobios(0,185), especialmente para este caso, al presentar los valores más bajos en la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en teoría hace responsable directo a rizobios solo y en combinación con las micorrizas de captación biológica del N atmosférico.

Para las columnas de las variables RS, RC y RA Se puede resaltar que la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ baja corresponde al tratamiento sin la aplicación de microorganismos, lo cual supone según la hipótesis 2 que las plantas de esta leguminosa utilizo el nitrógeno proveniente de los residuos incorporados como tratamientos (RC, RS y RA). Este resultado podría relacionarse con la riqueza nutricional de los microcosmos a consecuencia de la descomposición de los abonos verdes aplicados, la cual podría incidir negativamente en la asociación de ambos simbioses, RH y MA, con su hospedero, el quinchoncho.

Según se observó en los resultados obtenidos en la fase experimental I, la mineralización de las coberturas incrementó los contenidos de P y N del suelo en diferentes tiempos de su medición; y como consecuencia podría haberse producido una cantidad de N en el suelo con valor mínimo inhibitorio para el proceso de simbiosis del rizobios. Aunado a estudios más recientes **López et al., 2010**, sugieren la importancia de caracterizar y cuantificar los metabòlitos secundarios puesto que la práctica de aplicar abonos orgánicos incrementa la liberación de metabòlitos secundarios y se desconoce su incidencia en los procesos rizosférico.

Se ha descrito ampliamente en la literatura (**Barea y Azcón-Aguilar 1983; Sieverding, 1991; Barea, et al., 1991**) que la planta prescinde de las simbiosis con el rizobios o micorrizas si los contenidos de N o P en el suelo son suficientes para satisfacer sus requerimientos nutricionales. Este parece ser el caso para la FBN en todos los casos de abono verde se calculo las cantidades de materia fresca incorporada creció en presencia de los RC (32,26 Kg N/ha), RS (29,74 Kg N/ha) y RA (36,79 Kg N/ha). **González (2003)**, encuentra en el cultivo de la soya que dosis superiores a 7 Kg de N/ha son inhibitorias para la nodulación puesto que no inducen a la planta a formar un sistema nodular. Este resultado se sugiere que se debe estudiar la sincronización de las aplicaciones de los abonos verdes con las posteriores prácticas de inoculación de bacteria, puesto que afecta el establecimiento de rizobios en la raíz de la planta.

DeLuca et al. (1996) reporta que las aplicaciones de abonos verdes y fertilizantes darían lugar a concentraciones de N inorgánico potencialmente mineralizable capaz de inhibir la fijación de N₂. Sin embargo sería necesario realizar estudios posteriores de la dinámica del N en presencia de simbiosis y abonos verdes, que escapan a este estudio.

Es importante también señalar, que existen diversas hipótesis sobre la inhibición de la fijación simbiótica de N_2 . De esto se han reportado efectos tanto directos como indirectos, pero todos apuntan en el campo de la fisiología del nódulo, referidas a los mecanismos de absorción, transporte y metabolismo del NO_3 y de los derivados de su asimilación y/o reducción. Sin embargo estos estudios solo han permitido profundizar en los mecanismos básicos de la inhibición de la actividad nitrogenasa de la bacteria en los nódulos en presencia de N combinado, y poco han resuelto en el terreno práctico del cultivo de leguminosas en condiciones de campo, cuando se pretende cultivar a expensas fundamentalmente de la FBN, mientras existen cantidades variables y continuas de distintas formas de N combinado presente en el suelo.

Luque et al. (1999) plantea que la nodulación de las leguminosas es un proceso regulado por factores internos (autorregulación) y externos (fundamentalmente nitratos) y ha sugerido la existencia de algún componente común compartido por ambos tipos de regulación de la nodulación. Ensayos realizados por estos autores apoyan al etileno endógeno como posible mediador en la formación de nódulos y en la inhibición por nitratos.

Esta teoría coincide con los expuestos por **Caba et al., 2001**, en los cuales señala que el etileno exógeno es un potente inhibidor de la nodulación, pero la raíz inoculada y sobre todo los nódulos, producen significativamente más etileno que la raíz no inoculada, siendo ese etileno de origen vegetal.

Cuadro 7. Contenido de nitrógeno (%) en el vástago de *Cajanus cajan* desarrollado durante 8 semanas con los tratamientos de residuos y las diferentes combinaciones de microorganismos. Los datos son el promedio de cuatro replicas por tratamiento.

Tratamientos	N total (%)			
	Sin residuo (SR)	Residuo de Sorgo (RS)	Residuos de Crotalaria (RC)	Residuos de añil (RA)
Sin Inoculación (SM)	3.24 ab	2.81 ab	3.24 ab	3.42 b
Rizobios (RH)	3.49 b	2.90 ab	3.48 b	3.53 b
Micorrizas (MA)	3.24 ab	2.60 ab	3.09 ab	3.32 ab
Rhizobium + Micorrizas (RH+MA)	3.51 b	2.60 ab	3.24 ab	3.62 b
Rhizobium + Micorrizas+SE (RH+MA+SE)	3.41 b	2.08 a	2.65 ab	2.82 ab

*Los datos son el promedio de cuatro replicas por tratamiento. *Letras distintas indican diferencias significativas en la misma columna ($p < 0.05$)*

En el cuadro 7, se plasman los resultados de contenido de N en planta y reflejan un tendencia uniforme de los contenidos de este elemento en la planta, de allí podemos resaltar en la columna RA dos valores importantes reflejados en las variantes RH solo y RH+MA con (3.53 y 3.62) ($p < 0.05$) respectivamente, para el resto de las columnas de SR, RS y RC en forma general se destaca la inoculación de RH+MA (3.51) sin la aplicación de residuos y solo RH con la aplicación de RC (3.49) independientemente de la tendencia estadística resaltan variantes donde se utilizo la inoculación de microorganismos.

Como se menciona anteriormente la eficiencia en la fijación biológica es una relación que mide el nitrógeno acumulado por las leguminosas procedente de la atmosfera (^{14}N) y el que se aplica al suelo marcado isotópicamente (^{15}N). De esta premisa se analizan los resultados del contenido de nitrógeno en vástago de plantas de *Cajanus cajan*, y se puede deducir que el mejor efecto en la toma de este elemento resulto de la combinación de sin microorganismos (SM) con todas las variantes de abonos utilizados SR, RS, RC, y RA,

observándose un efecto inhibitorio de la fijación biológica del nitrógeno, para algunos tratamientos como se explica anteriormente en el cuadro 6.

En relación a los valores obtenidos en los tratamientos RHMA+SE, se podría indicar que al presentarse la condición de suelo estéril solo se garantiza el desarrollarlo de las cepas que fueron aisladas *per se* del suelo en estudio, y de esto se analiza que donde se hizo la aplicación de abonos verdes, se evidencia los valores más bajos del N en tejido, y en aquel tratamiento donde predominó el tratamiento sin residuo, estos valores fueron superiores, lo cual podría indicar la aplicación de abonos verdes afecto de forma negativa el desarrollo de las cepas evaluadas especialmente en el caso de rizobio.

Cuadro 8. Número (No) y peso fresco de nódulos (g) de plantas de *Cajanus cajan* desarrolladas durante 8 semanas con los tratamientos de residuos en combinación con inoculantes rizobios y micorrizas arbusculares.

Tratamientos	Sin residuo (SR)	Residuo de Sorgo (RS)	Residuos de Crotalaria (RC)	Residuos de añil (RA)
Sin inoculación (SM)				
No. Nódulos/pl	0.5 a	0.25 a	2.5 a	2.0 a

Peso nódulos/pl(g)	4.66 a	0.17 a	7.27 a	3.9 a
Rizobios (RH)				
No. Nódulos/pl	2.25 a	1.25 a	4.5 a	4.5 a
Peso nódulos/pl(g)	7.15 a	18.5 a	7.75 a	10.5 a
Micorrizas (MA)				
No. Nódulos/pl	1.6 a	4.0 a	1.2 a	2.7 a
Peso nódulos/pl(g)	3.82 a	51.4 a	5.0 a	7.5 a
Rizobios+Micorrizas (RH+MA)				
No. Nódulos/pl	4.5 a	3.25 a	3.8 a	4.0 a
Peso nódulos/pl(g)	5.6 a	13.2 a	9.5 a	6.6 a
(RH+MA+SE)				
No. Nódulos/pl	4.75 a	6.9 a	0.273 a	0.265 a
Peso nódulos/pl(g)	6.15 a	26.6 a	9.3 a	5.7 a

Los datos son el promedio de cuatro replicas por tratamiento. *Letras distintas indican diferencias significativas en la misma columna ($p < 0.05$)

En el cuadro 8 se presentan los resultados del número y peso de nódulos de las plantas de *Cajanus cajan*. Los tratamientos con la doble simbiosis (RH+MA) para las variantes SR, RS, y RC arrojan los valores más altos en cuanto al número y peso de nódulos, sin embargo estadísticamente no son significativos.

Para la variante RA, la mejor nodulación se encuentra en las inoculaciones con RH, presentando valores de (4,5 y 10,5) de número de nódulos y peso respectivamente, dados estos resultados pudieran indicar un comportamiento deseado para dicho tratamiento en comparación con el control sin aplicación de microorganismos.

Es evidente en que los resultados apuntan que algún factor o factores fueron poco favorables en el desarrollo de la nodulación de esta leguminosa en este experimento, y podría decirse que el proceso de FBN resulta particularmente sensible a determinadas circunstancias ambientales; especialmente en los tratamientos donde se hicieron

aplicaciones de abonos verdes, debido a que hubo un proceso previo de incorporación de residuos y a partir de la última medición previo a la siembra del cultivo indicador, se presume un aumento en las cantidades (no cuantificadas) de N que pudiesen afectar la participación de los microorganismos en la FBN.

Herridge et al. (1984) describe el efecto “iniciador” donde la presencia de N combinado es esencial en las primeras etapas de desarrollo de la mayoría de las leguminosas, entre el período en el cual se ha consumido las reservas de la semilla y, antes de que la FBN esté suficientemente activa. Sin embargo, es bien conocido que el N combinado especialmente NO_3 inhibe las sucesivas etapas de la nodulación y por ende el proceso de fijación de N_2 (**Streeter, 1988**).

Por otra parte **Izaguirre (2005)** enfatiza que hasta la presente no se ha definido la relación entre la eficiencia simbiótica y otras características de la bacteria, ni parece posible predecir la efectividad de un sistema simbiótico leguminosa-rizobios con base a la taxonomía del hospedero, o al hábitat del que aquella ha sido aislada y señala la conveniencia de incluir en la recolección de rizobios, la variables correspondientes de hábitat y hospedero.

Alternativamente hay diversas estrategias agrícolas tendentes a minimizar el efecto del N del suelo o de las diferentes fuentes de fertilizantes nitrogenados sobre la nodulación y fijación simbiótica de N_2 entre las cuales está la selección de líneas o cultivares (**Park y Buttery, 1989**) tolerantes en mayor grado a la presencia de NO_3 además de prácticas de manejo que logren reducir la mineralización del N orgánico mediante la relación C/N de suelo (**Peoples y Herridge, 1990**) y, de incorporación de resto de abonos verdes ricos en C.

La dinámica en la tasa mineralización de abonos verdes en el suelo es compleja y requiere del manejo de todos mecanismos bioquímicos de la descomposición, es preciso profundizar en los efectos que podrían tener las cantidades de metabolitos secundarios liberados al suelo; como saponinas, alcaloides, flavonoides, fenoles entre otros, en experimentos de microcosmos sobre efectos en la fijación biológica del N (López, 2010)

En la cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos en la determinación del efecto de las distintas variantes y tratamientos sobre la longitud de las raíces de las plantas de quinchoncho extraídas de una muestra de suelo (Long. R) y sobre el grado de micorrización de las raíces (% LRC).

Cuadro 9. Longitud de raíces (LR) y % de longitud de raíces colonizadas (%LRC) por MA de plantas de *Cajanus cajan*. Los datos son el promedio de cuatro replicas por tratamiento. Letras distintas en la columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tratamientos	Sin residuo (SR)	Residuo de Sorgo (RS)	Residuos de Crotalaria (RC)	Residuos de añil (RA)
Sin inoculación (SM)				
Longitud Radical (m)	0.53 <i>ab</i>	0.57 <i>abc</i>	0.31 <i>a</i>	0.82 <i>abcd</i>
% LRC	20.92 <i>a</i>	27.60 <i>ab</i>	49.94 <i>bcde</i>	47.68 <i>abcd</i>
Rizobios (RH)				
Longitud Radical (m)	0.87 <i>bcde</i>	0.77 <i>abcd</i>	1.34 <i>e</i>	1.25 <i>de</i>

% LRC	58.31 <i>cdef</i>	40.66 <i>abc</i>	72.51 <i>defg</i>	76.91 <i>efg</i>
Micorrizas (MA)				
Longitud Radical (m)	1.09 <i>cde</i>	0.90 <i>abcd</i>	0.90 <i>bcde</i>	0.87 <i>bcde</i>
% LRC	64.60 <i>cdefg</i>	41.67 <i>abc</i>	60.41 <i>cdef</i>	82.47 <i>fg</i>
(RH+MA)				
Longitud Radical (m)	1.19 <i>de</i>	1.15 <i>bc</i>	0.83 <i>abcd</i>	1.04 <i>bcde</i>
% LRC	88.33 <i>g</i>	63.05 <i>cdefg</i>	73.84 <i>defg</i>	84.75 <i>fg</i>
(RH+MA+SE)				
Longitud Radical (m)	1.19 <i>de</i>	1.04 <i>bcde</i>	0.94 <i>bcde</i>	1.10 <i>cde</i>
% LRC	56.60 <i>cdef</i>	50.54 <i>bcde</i>	71.57 <i>defg</i>	36.53 <i>abc</i>

*Los datos son el promedio de cuatro replicas por tratamiento. *Letras distintas indican diferencias significativas en la misma columna ($p < 0.05$)*

Los porcentajes más altos de raíces colonizadas por micorrizas, se encuentran en los tratamientos con la doble simbiosis para todas las variantes de Sin residuo (88,83), RS (63,05), RC (73,84) y RA (84,75) y presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación con los demás tratamientos donde solo se hizo una aplicación por separado.

Estos valores de micorrización podrían haber contribuido a mejorar los valores de materia seca del cultivo *Cajanus cajan*, donde para los RS la aplicación de RH+MA+SE se obtuvo (2,163 g) , en los RC con RH+MA se obtuvo (1,703 g), y en los RA con RH (1,687 g) si se comparan con los tratamientos donde no hubo aplicación de microorganismos.

En cuanto a los resultados obtenidos para la longitud de raíces, se podría tomar en cuenta aquellos autores que señalan especies de rizobios, que sintetizan auxinas que promueven la formación de raíces laterales en las leguminosas (**Nieto y Fankerberger, 1990**). Así mismo estas bacterias sintetizan giberelinas (**Atzorn et al., 1998**) y citoquininas (**Martinez et al., 2007 y Martinez y Dibut, 2006**). Todo esto explica los resultados en la cuadro 4 en relación con el alargamiento de las raíces.

XII. Conclusiones

- Para los suelos de la localidad de Espino, el uso de abonos verdes utilizados posteriormente como residuos vegetales es una práctica de manejo conservacionista, que realizan aportes de nitrógeno y fósforo durante la etapa de descomposición especialmente la última medición correspondiente al día 29.
- La utilización de microorganismos de uso potencial para la Biofertilización, permite complementar la nutrición del *Cajanus Cajan*, durante las 8 semanas de evaluación, al presentarse los mejores valores de materia seca en aquellos casos donde se hizo la aplicación de microorganismos obteniéndose residuos de sorgo con aplicación de rizobios y Micorrizas (2,163 g), residuos de

crotalaria con la doble simbiosis (1,703 g) y residuos de añil con aplicación de rizobios 1,687 g).

- La naturaleza de la dinámica microbiana en los suelos, permite un potencial uso de inoculantes como rizobios y micorriza, para disponer de N y P nutrientes indispensables en el desarrollo de los cultivos, sin embargo combinar prácticas como el uso de abonos verdes, donde varíen los niveles de N y se desconozca el efecto que pudiera tener los metabolitos secundarios, en suelo, además de otros factores como pH, Al^{+3} que no fueron considerados, pudiera afectar de forma desfavorable en el proceso FBN.
- La técnica de dilución isotópica aplicada con ^{15}N , indicó que los microorganismos rizobios y micorrizas fueron más efectivos en la FBN del *Cajanus* en ausencia de los residuos ó abonos verdes aplicados, lo cual sugiere realizar experimentos de incubación en condiciones más controladas y así conocer la dinámica de mineralización e inmovilización de N.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aciego, J., D. Borges y J. Rojas (1995) Efecto de los sistemas de labranza conservacionista sobre la dinámica de poblaciones microbianas de un suelo degradado del estado Yaracuy. Revista VENEZUELOS, 74 Vol. 3, Nº 2, 1995
- AE, N., J. Ariha and Okada.(1991). Phophorus uptake mechanisms of Pigeonpea Grown in alfisol and vertisols.ICRISAT. International Crops research institute for the Semi Arid Tropics. Phophorus nutrition of grain legumes in the Semi Arid Tropics (Johasen, C., Lee, K. K. And Sahwat, K. L., eds) Patancheru A. p. 502-304.
- Altieri M.A. (1994). Bases agroecológicas para una producción agrícola sustentable. Agriculturatécnica (Chile) 54(4):371-386
- Anand R.C., y Dogra R.C. (1997) Comparative efficiency of rhizobium/Bradyrhizobium spp. Strains in nodulating *Cajanus cajan* in relation to characteristic metabolic enzyme activities
- Atzorn R., A. Croiser, C.T. Wheeler y G. Sandbderg (1988) Production of gibberelins and indole acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *phaseolus vulgaris*.

- Auge, R.M. (2001). Stomatal behavior of arbuscular mycorrhizal plants, In *Arbuscular mycorrhizas. Physiology and function*, Kaplanik, Y and Dovel, D.D., Eds. Kluwer Academic Publishers, Boston, 201-237.
- Axmann H, y F. Zapata. (1990). Stable and radioactive isotopes. In: *Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships*. International Atomic Energy Agency, Viena 310 p.
- Azcón-Aguilar C., y J. M. Barea. (1980). Micorrizas. *Investigación y Ciencia*. 47:8-16
- Baca B., S Urzua. R.Pardo (2000) Fijación biológica del nitrógeno. *Ciencia y cultura elementos* No. 38, Vol. 7 Julio-Agosto 2000. Pag. 43
- Barber, K.L., L.D. Maddux, D.E. KisseL, G.M. Pierzynski y B.R.Bock. (1992). Corn responses to ammonium and nitrate-nitrogen fertilization. *Soil Sci Soc. Am J*. 56: 1166-1171
- Barcelo I., Gardezhi A., Bussy A., Solis H y López E. (2008) *Leucaena leucocephala*, asociada con Rizobios y micorrizas arbusculares para restaurar suelos agrícolas contaminados con descargas industriales. XXXI Congreso Latinoamericano. AIDIS Santiago de Chile Centro de Eventos Casa piedra 11 al 15 Octubre 2008.
- Barea J.M., Toro. M., Orozco M.O., Campos E., y Azcón R. (2002). The application of isotopic (^{32}P and ^{15}N) dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and Rizobios to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops nutrient cycling in agroecosystems 63:35-42
- Barea M., J. y Olivares J. (1998). Manejo de las propiedades biológicas del suelo. En: Jiménez D., R y Lamo J. *Agricultura sostenible, Agrofuturo* Ed. Mundi - Prensa pp 173-190.
- Barea, J. M. (1991). Cuantificación biológica de nitrógeno mediante el uso de ^{15}N . En: J. Olivares y J. M. Barea. *Fijación y movilización biológica de nutrientes*. Vol. II. CSIC Madrid. 265p.
- Barea, J. M., C. Azcón-Aguilar, J. A. Ocampo y R. Azcón. (1991). Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículoarbusculares En: J. Olivares y J. M. Barea. *Fijación y movilización biológica de nutrientes*. Vol. II. CSIC Madrid. 265p.

- Barea, J. M., y Azcón-Aguilar, C. (1983). Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. En *Advances In Agronomy*, 36. Brady, N. C: (Ed) Academia Press, New York. Pp.1-54
- Baylis, G.T.S. (1975): The magnolioidmycorrhiza and mycothopy in root systems derived from In: *Endomycorrhizas* I.E Sanders, B. Mosse and P.B Tinker (Eds) Academia Press, London pp 149-171.
- Becana, M., y Bedgar, E. (1991). Metabolismos del nitrógeno y oxígeno en nódulos de leguminosa. En: Olivares J., y Barea M. Fijación y movilización biológica de nutrientes. Vol. II. CSIC. Madrid pp 33-49.
- Bergeys's manual of systematic, 2 edition. ED. New York, Springer, 2005. V.2.1388p
- Bethlenfalvay, G.J, y Linderman , R. G. (1992). Mycorrhizae in sustainable agriculture.WI; American society agronomy Special Publitation p 54.
- Boddey, R.M., B.J.R. Alves, V.M. Reis y S. Urquiaga (2006): Biological Nitrogen Fixation in Agroecosystems and in Plant Roots. En *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. Taylor and Francis Ed., Boca Ratón, pp 177-190
- Bohlool, B., Ladha, J., Garrity, D., y George, T. (1992). Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant and Soil*. 141: 1-11
- Bradstreet, R. B. (1965) The Kjeldahl meted for organic Nitrogen. Academic Press. New York.
- Bünemann, E., W.B. Steward y E. A. Paul (2004): PhosphorusDymanics in a highly weathered Soil as revealed by isotopic labeling Tecniques. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68: 1645-1655
- Bünemann, E., D. K. Friesen, B. L. Turner y E. Frossard (2004): Maize Productivity and Nutrient Dynamics in Maize-fallow Rotations in Western Kenya. *PlantSoil*, 264: 195-208
- Caba, J.M.; Poveda, J,L. y Ligeró, F. (2001). Control de la nodulación en las leguminosas: Implicación de las fitohormonas. En: *compagnoni, a cambiando le regoleEuropee per l`agricultura biológica. L`Informatore agrario* 53 (31). 1997 60-61

- Carrillo S., C. (2000) Técnicas de micorrización en viveros con hongos ectomicorrizas experiencias realizadas em el centro nacional de mejora forestal "El serranillo". Tercer curso avanzado de viveros y producción de la planta forestal. Guadalajara 2000.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. Simbiosis Leguminosa - Rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Cali
- Colina A., A Higuera., A Gómez., N Rincón., J. Puentes., y E Segovia. (2008). mercado potencial de subproductos derivados del quinchoncho (*CajanusCajan L. Millsp.*) para consumo humano en Maracaibo. *Reb. Fac. Agron (LUZ)*. 25: 334-363.
- Córdova-Sánchez S., Castelán-Estrada M., Salgado-García S., Palma-López J., Vera-Núñez J., Peña-Cabriales J., Lagunes-Espinoza L., Cárdena Navarro R. (2011) Fijación biológica de nitrógeno por tres fabáceas (leguminosae) en suelos ácidos de Tabasco, México. *Avances en Investigación agropecuaria*. 15(1)31-50
- Cormerma, J. y R. Paredes. (1978). Principales limitaciones y potencial agrícola de las tierras en Venezuela. *Agronomía Tropical*. Vol 28 (2):71-85
- Corredor, G. (2003). Micorrizas arbusculares: Aplicación para el manejo sostenido de los agroecosistemas. Programa nacional de recursos biofísicos, Corpoica, Bogota, 45p
- Cuenca, Gisela, Caceres, Alicia, Oirdobro, Giovanni et al. Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *INCI*. [online]. ene. 2007, vol.32, no.1 [citado 02 Julio 2009], p.23-29. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000100006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0378-1844.
- Deluca, T. H., Drinkwater B. A., Wiefeling B.A. (1996). Free-living bacteria in temperate cropping systems: Influence of nitrogen source. *BiolFertil. Soil* 23: 140-144
- Dôbereiner, J. Y Day John.(1974). Importancia de la fijación simbiótica de nitrógeno en la rizosfera de gramíneas tropicales. En: Bornemiza E. y Alvarado A. Manejos de

- suelos en la América tropical. Publicado por University consortium of soil the tropics, Soil Science. Department North Carolina State University. 640 p.
- Douds D. D., L. Galvez, R. Janke and P. Wagoner (1995) Efect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscularmycorrhizal fungi. *Agriculture, Ecosystems and environment* 52:111-118.
- Duque, M.P. y Toro, M. (2010) Efecto de las prácticas agrícolas sobre las micorrizas arbusculares en agroecosistemas venezolanos. Manuscrito sometido a consideración en la revista *Interciencia*.
- Echeverría H., San Martín N.F., Bernozí R. (1996). Mineralización de azufre y su relación con la de nitrógeno en suelos agrícolas. *Ciencia del suelo*. 14: 107-109
- España M., E. Cabrera-Bisbal and M. López. (2006). Study of nitrogen fixation by tropical legumes in acid soil from Venezuelan savannas using ¹⁵N. *Interciencia*. 31:197-201.
- Ferrera-Cerrato, R., González Chávez, C. & Rodríguez Mendoza M.A. 1993. *Manual de Agromicrobiología*. Editorial Trillas, México, 142 pp
- Fortuna, P., A.S. Citernesi, S. Morini, C. Vitagliano, and M. Giovannetti. (1996). Influence of arbuscularmycorrhizae and phosphate fertilization on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. *Tree Physiology*. 16: 757-763.
- Frioni L. (2011) *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. 1 ra edición Buenos Aires. 768 p
- George, E. (2000). Nutrient uptake: Contribution of arbuscularmycorrhizal fungi to plant mineral nutrition, in *ArbuscularMycorrhizas: Physiology and Function*, Kapulnik, Y. and Douds, D. D., Eds., Klumer Academic Publishers, Boston, 307-343
- Gerdermann, J. W. y Nicolson, T. H. (1963) Spore of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235-244.
- Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi S. (1983). The physiology of vesicular-arbuscularmycorrhizal roots. *Plant and soil*. 71:197-209

- Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi S. (1989). Phosphorus metabolism in mycorrhizae. In: Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi. Boddy, L.; Marchant, R., y Read, D. J. (Eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 227-241
- Giovanetti, M. y Mosse, B. (1980). An evaluation of technique for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489-500.
- Grierson, P.F., P. Smithson, G. Nziguheba, S. Radesma y N.B. Comeford (2004): Phosphorus Dynamics and Mobilization by Plants. En *Below-ground Interactions in Tropical Agroecosystems*, CABI Publishing, Cambridge MA., pp. 127-140
- Gryndler, M. (2000). Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms, In *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*, Kapur, Y. and Davds, D. D., Eds, Academic Publishers, Boston, 239-262
- Hardarson G, y Danson S. (1990). Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno mediante la metodología de ^{15}N . In: empleo de técnicas nucleares en los estudios de la relación suelo-planta. Agencia Internacional de Energía Atómica Viena 310 p.
- Hardarson G. (1991). Métodos para aumentar la fijación biológica de nitrógeno. En: Peña-Cabriles y Zapata F. Aumento de la Fijación biológica del nitrógeno en el Fríjol común en América Latina editado por resultados de un programa FAO/OIEA de investigación coordinada 1986 – 1991. 203p.
- Hardarson, G. y Danso, S. (1993). Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil.* 152:19-23
- Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158-161.
- Hernandez B., M. Poht, and D. Focht (1997) Increased effectiveness of competitive *Rhizobium* upon inoculation of *Cajanus cajan*. *Applied and environmental microbiology.* Vol 53(9) 2066-2068
- Hernandez-Diaz, M.I. y M. Chailloux-Laffita.. (2001). La nutrición mineral y la biofertilización en el cultivo de tomate. *Temas de Ciencias y Tecnología: Ensayos* 5:11-27.

- Herridge, D.F.,(1984) Effects of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root-bleeding and vacuum extracted exudates of soybean Crp Sci., 25: 173-179
- Higuera, A., L. Castillo, C. García, I. Soto, L. Sandoval y R. Lobo. (1998). Efecto de la frecuencia y altura de corte sobre el rendimiento y calidad de forraje de diferentes variedades de quinchoncho *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Rev. Fac. Agron. LUZ* 15:188-198.
- Hocking P. J., G. Keertihsinghe, F. W. Smith and P. J. Randall.(1997). Comparision of the ability of different crop species to access poorly-available soil phosphorus. T. Ando et al.(Eds). *Plant nutrition for sustainable food production and environmet.*305-308.
- Howeler R. H., Sieverding E. y Saif S. (1987) Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pasture. *Plant and soil* 100:249-283
- IAEA (1995).Nuclear methods in soil-plant aspects of sustainable agriculture.Proceeding of an FAO/IAEA regional seminar for Asia and the pacific.IAEA: Australia 224 p.
- Izaguirre, M. L. (2005) Distribución geográfica, nodulación y comportamiento agronómico de tres especies de sebanias nativas de zonas inundables en Venezuela. *Agronomía Trop.*, vol.55, no.1, p.63-82. ISSN 0002-192X.
- Jaime-Vega M.C., N Rodriguez., E Gonzales.(2003) Aplicación de micorrizas sobre viña durante la fase de vivero. *Actas de Horticultura No39 X congreso Nacional de ciencias horticolas.* 463 Viticultura.
- Kwabiah, A. B. (2003): Response of Soil microbial Biomass Dynamics to Quality of Plant Materials with Emphasis on P Availability. *Soil Biol. Biochem.* 35: 207-216
- Lehmann J., C. Lascano y J.J. Jimenez (2001). Phosphorus management for perennial crop in central Amazonian up plant soils. *Plantsoil* 237, 309-319.
- López de R. I., M. Silva de Y. J. Comerma. (1987). Suelos ácidos-avance en la construcción del sistema experto para hacer recomendaciones en estos suelos. 9p. en: simposio manejo de suelos ácidos en los trópicos IX congreso venezolana X CLCS. Maracaibo, Edo. Zulia-Venezuela del 14 al 21 de Junio de 1987

- López M. (2011). Manejo agroecológico del sistema sorgo-frijol, efecto sobre la fertilidad del suelo y microorganismos con potencial para biofertilizar agroecosistemas venezolanos. Tesis doctoral. Universidad central de Venezuela. Facultad de Agronomía, Postgrado en Ciencias del Suelo.
- López M., Bolívar A., Salas M., y De Gouveia M. (2006). Practicas conservacionistas y rotación con quinchoncho alternativas sustentables para los agroecosistemas de sabanas d Guárico, Venezuela. *Agronomía Trop* 56(1:75-109).
- López M., I Lopéz., M España., A Izquierdo. y L Herrera. (2007). Efecto de la fertilización inorgánica sobre la disponibilidad de nutrientes en el suelo, nivel nutricional del la planta y hongos micorrízicos arbusculares en plantaciones de cacao Teobroma cacao. *Agronomía Tropical* 57 (1) 31-43
- López M., N Alfonso., A Florentino., y M Perez. (2006). Dinámica del fósforo y reducción del aluminio intercambiable en un ultisol sometido a manejo conservacionista. *Interciencia*, abril, Vol., 31, numero 004, pp.293-299.
- Luque, C.; Miralpeix, M. J.; Recalde, L.; Caba, J. M. y Ligeró, F. (1999). Distribución de la nodulación y la biosíntesis de etileno en raíces de soja (*Glycinemax*) cv. Bragg. En: (<http://www.cartuja.csic.es/SEFV99/abstracts/nuticion/p.3-30.html>).
- Mafongoya PL, KE Giller y CA Palm. (1998). Descomposition and nitrogen realease patterns of tree pruning and litter. *Agroforestry Systems* 3877-97
- Marschner H., y B. Dell, (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal. *Plant and Soil*. 159: 89-102
- Marschner H. (1999): *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, Londres, 889 pp
- Martínez G.T., Santamargarita F., J., Barriaga R.J., (2004) Experiencias de micorrización en viveros forestales de la junta extremadura. *Foresta No 27*, 3 er trimestre 152-156
- Martínez J., L. Leonte, G. Castellano y A. Higuera. (2003) evaluación de 25 líneas de quinchoncho *Cajanuscajan* (L.) Millsp con fines de selección para uso como leguminosa argustiva forrajera. *Rev. Científica. FCV-LUZ*. XIII (3); 173-181.
- Martínez V. R., y B. Dibut (2006): Practical applications of Bacterial Biofertilizers and Biostimulators. En *Biological Approachs to Sustainable Soil Systems*, Francis and Taylor Publ., Nueva York, pp 467-477.

- Martínez Viera, R. (2004) desarrollo y manejo de los biofertilizantes con énfasis en el trópico. INIA-CENIAP. Taller sobre recursos agroecológicos, del 30 de noviembre al 03 de diciembre del 2004
- Martínez Viera, R. (2006): Los biofertilizantes y bioestimuladores bacterianos como pilares básicos de la Agroecología. Ed. CIARA, Caracas, 35 pp.
- Martínez Viera, R., M. López, B. Dibut, C. Parra y J. Rodríguez. (2007). La fijación biológica del Nitrógeno atmosférico en el medio tropical, 166 páginas. Publicado por el Ministerio del Poder Popular Para la Agricultura y Tierras. De la República Bolivariana de Venezuela. Número de depósito legal IF 80020086302515.
- McLaughlin , Y. and T. R. James. (1991). Effect of phosphorus supply to the surface roots wheat on root extension and rhizosphere chemistry in an acidic subsoil. *Plant and Soil*. 134:73-82
- Míreles, M., J. Comerma y J. Quintero. (1998). tipos de uso de la tierra en el nororiente de Guarico. Maracay, Ven. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 34 P. (serie C. Nº 11).
- Morton, J. B. (1988). Taxonomy of Vesicular Arbuscularmycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon*, 32:267-234
- Morton, J.B. y Benny, G.L.(1990). Revised classification of arbuscularmycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37:471-491
- Muraoka T., E.J. Ambrosano³, F. Zapata, N. Bortoletto, A.L.M. Martins, Murphy, J. & Riley, J. P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim.Acta*, 27, 31-36.
- Myers RJK, CA Palm, E Cuevas, IUN Gunatilleke and M Brussand. (1994) the Synchronization of nutrient mineralization and plant nutrient demand. In the biological management of tropical soil fertility,. Ed. Woomer PL and Swift mj PP 81-116 John Wiley and Sons, Chichester, UK
- Nierenberg D. (2001) Fertilidad Tóxica. *Rev. World wath* 2001.pag 41-47

- Nieto, K.F. y W. T. Frankenberger (1990): Microbial Production of Cytokinins. En Soil Biochemistry, vol. 6, Marcel Dekker Ed., Nueva York, pp 195-248.
- Nziguheba, G. y E. K. Bünemann (2005): Organic Phosphorus Dynamic in tropical Agroecosystems. En Organic Phosphorus in the Environment, CAB Internacional, Londres, pp. 243-268.
- Olsen R.S. Cole CV Watarabe FS y Dean L. A. (1954). Estimation of available phosphorus in Soils by extration with sodium bicarbonato EEUU ar 93 app
- Organic phosphorus workshop (2005): systhesis and recommendation for future research. En: Organic phosphorus in the environment, CAB internacional, Londres, pp. 377-380
- P.C.O. Trivelin, A.E. Boaretto y W.B. Scivittaro⁵ (2001) Eficiencia de abonos verdes (crotalaria y mucuna) y urea, aplicados solos o juntamente, como fuentes de n para el cultivo de arroz. Revista Terra 20: 17-23
- Palm C.A., R.J.K Myers. y Nandwa. (1997). Combines use organic and inorganic nutrient sources for soil fertility maintenance and replenishment. In Buresh RJ, Sánchez P.A, Calhoun F(eds) replenishing soil fertility in Africa. SSSA. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA. Pp.193-217
- Palm, C.A. (1995): Contribution of Agroforestry Trees to nutrient Requirements of intercropped Plants. Agroforestry Systems, 30: 105-124
- Park, S. J. And Buttery, B.R. (1989) Inheritance of nitrate tolerant supernodulation in EMS induced mutants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) J. Llered 80: 486-488
- Peoples, M. y Craswell, E. (1992). Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. Plant and Soil. 141:13-39
- Peoples, M.B. y Herridge, D.F. (1990). Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture. Advances in agronomy 44: 155-223
- Phillips, J. M. y Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesiculat-arbuscularmycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans Br. Mycol. Soc. 55, 158-161

- Quintana E., (2001): Las leguminosas en la alimentación venezolana durante cinco décadas (1945-1997) *Revista EspNutr Comunitaria* 7(3-4): 70-77
- Rivero C. (1993). Evaluación de la materia orgánica nativa e incorporada en tres suelos de importancia agrícola en Venezuela. Tesis Doctoral. Facultad de agronomía. UCV. Maracay. 250p
- Rivero C. (1997). Efecto del uso de residuos vegetales sobre algunas propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo Túren. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* (23):207-224.
- Rodríguez M. (1993). Asociación Rizobios leguminosa. En: manual de Agromicrobiología. Editado por Ferrera R, Gonzalez M, y Rodríguez M. editorial trillas 250 p.
- Serralde A., y Margarita M. (2004). Analisis de poblaciones de micorrizas en maíz (zaemays) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos *CORPOICA Vol. (5)* 31-40
- Sieverding, E. (1991). *Versicular-ArbuscularMycorrhizamanagement in tropical agroecosystems.*, Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit, Breren, Germanyn, pp.
- Soto -Urzúa L., Baca B., (2001). Mecanismo de la protección de la nitrogensa a la inactivación por oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 43:37-49
- St. John, T.V. (1980). Root size, root hairs and micorrhizal infection: a re-examination of Baylis hypothesis with tropical trees. *New Phytol.* 84: 483-487
- Streeter J. G., (1988) Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *CRC Crit Rev Plant Sci* 7:1.23
- Tenant, D., (1975). A test of a modified line intersects method of estimating root length. *J. Ecol.* 63: 995 – 1001.
- Toro M., R. Azcón y J.M. Barea.(1997). Improvement of arbuscularmycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32 P) y nutrient cycling applied and environmental microbiology p. 4408-4412

- Toro M., R. Azcón y J.M. Barea .(1998). The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactite effects of Rizobios genotype, mycorrhizal fungi, phosphate solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. *New Phytol* .138. 265-273
- Toro, M., Azcón, R. y Herrera, R. (1996) Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *Puerariaphaseoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. *Biol. Fert..Soils* 21/1-2: 23-29.
- Toro, M., Bazo, I., y López, M. (2008) Micorrizas arbusculares y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, Biofertilizantes nativos de sistemas agrícolas bajo manejo conservacionista.
- Umarov, M., M. (2001).The role of soil microorganismas in the turnover of chemical elements in terrestrial ecosystems.*EuriansoilScience*. 34: S74-S81
- Videla C., Pazos A., Trivelin P. A., Echeverria H. E., Studdert G. A., (2005) Mineralización bruta de nitrógeno bajo labranza convencional, siembra directa y pastura. *Cienc. Suelo (online)* 2005, vol. 23, n.2, pp.133-144. ISSN 1850-2067
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the study of root nodule bacteria.IBP.Hanndbook N° 15, Blackwell Scientific Publication.Oxford and Edinburgh.
- Walker, C. y Trappe, J.M. (1981) *Acaulosporaspinosaspnov* with a key to the species of *Acaulospora* *Mycotaxon* 12:515-521
- Yao, Q. et al (2001). Movilization of sparingly soluble inorganic phosphates by the external mycelium of an arbuscularmycorrhizal fungus, *plant and soil* 230,279-285