

Artículo Científico

Mejora del crecimiento de gramíneas asociadas a *Leucaena leucocephala* co-inoculada con un hongo micorrízico arbuscular y un aislado de rizobio

Growth improvement of grasses associated with Leucaena leucocephala co-inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungi and a rhizobia isolate

GUSTAVO CRESPO-FLORES¹, HUGO M. RAMÍREZ-TOBIAS¹, MOISÉS R. VALLEJO-PÉREZ², HERIBERTO MÉNDEZ-CORTÉS¹ Y PEDRO J. GONZÁLEZ-CAÑIZARES³

¹Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Soledad de Graciano Sánchez, SLP, México. agronomia.uaslp.mx

²Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis, SLP, México. ciacyt.uaslp.mx

³Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. inca.edu.cu

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la asociación de *Leucaena leucocephala*, y su co-inoculación con una cepa del hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Claroideoglobus claroideum* y un aislado local de rizobio, sobre el comportamiento de las gramíneas asociadas (*Bouteloua gracilis*, *Bouteloua curtipendula* y *Setaria macrostachya*). Se estudiaron las estructuras micorrízicas y la nodulación. Se realizaron tres experimentos independientes, uno por cada gramínea, en asociación con *L. leucocephala* co-inoculada y sin inocular, o sola (como testigo). Los pastos asociados con *L. leucocephala* co-inoculada produjeron mayor cantidad de tallos que aquellos asociados con *L. leucocephala* sin inocular. *B. gracilis* y *B. curtipendula* acumularon mayor biomasa cuando se asoció con *L. leucocephala* co-inoculada. Las concentraciones de clorofilas *a*, *b* y totales en *S. macrostachya* y la de clorofila *b* en *B. gracilis* se vieron favorecidas por la asociación con *L. leucocephala*. La co-inoculación promovió el desarrollo de estructuras micorrízicas en la rizósfera y el número de nódulos en raíces de *L. leucocephala*, aunque el porcentaje de nódulos efectivos no reflejó diferencias entre tratamientos. En conclusión, la asociación de gramíneas con *L. leucocephala* y su inoculación con HMA y aislados de rizobios locales no solo promueve el desarrollo de estructuras micorrízicas y la nodulación, sino también aumenta el crecimiento y el contenido de pigmentos fotosintéticos en las gramíneas asociadas.

Palabras clave: Asociaciones leguminosas-gramíneas de clima semiárido, *Claroideoglobus claroideum*, bacterias fijadoras de nitrógeno, nodulación, estructuras micorrízicas, clorofilas.

Abstract

The objective of this study was to assess the effect of the association of *Leucaena leucocephala*, and its co-inoculation with a strain of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Claroideoglobus claroideum* and a local isolate of rhizobium, on the performance of associated grasses (*Bouteloua gracilis*, *Bouteloua curtipendula* and *Setaria macrostachya*). The mycorrhizal structures and nodulation were also studied. Three independent experiments, one for each grass species, were grown in association with *L. leucocephala* co-inoculated and non-inoculated, or alone (control treatment). Grasses associated with co-inoculated *L. leucocephala* produced a greater number of stems than those associated with non-inoculated *L. leucocephala*. *B. gracilis* and *B. curtipendula* grown with co-inoculated *L. leucocephala*

Correspondencia: Gustavo Crespo-Flores, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), SLP, México. Correo electrónico: crespoflores76@gmail.com

accumulated higher biomass. The concentration of chlorophylls *a*, *b* and total chlorophylls in *S. macrostachya* were favored by the association with *L. leucocephala*; whereas in *B. gracilis* such effect was only observed for chlorophyll *b*. Co-inoculation promoted the development of mycorrhizal structures in the rhizosphere and the number of nodules in roots of *L. leucocephala*, although the percentage of effective nodules did not reflect differences due to treatments. In conclusion, the association of grasses with *L. leucocephala* and its inoculation with AMF and local rhizobium isolates not only promotes the development of mycorrhizal structures and nodulation, but also increases growth and the content of photosynthetic pigments in the associated grasses.

Keywords: Mixtures of legumes and semiarid grasses, *Claroideoglossum claroideum*, mycorrhizal structures, nitrogen fixing bacteria, nodulation, chlorophylls.

Introducción

La dieta base para la producción bovina en condiciones tropicales, especialmente en la región latinoamericana, se compone principalmente de pastos y otras fuentes forrajeras (Aguilar et al. 2019; Urbina-Cruz et al. 2019), pero para lograr la rentabilidad en este tipo de sistemas es necesario obtener niveles de producción forrajera que garanticen cubrir las demandas nutricionales de los animales. En las áreas ganaderas del trópico predominan los pastos naturales e introducidos, en su mayoría gramíneas; sin embargo, se ha demostrado la importancia de promover en estas áreas el uso de leguminosas, principalmente las arbóreas como *L. leucocephala*, ya que permite al animal seleccionar una dieta más variada y de mejor calidad (Peniche-González et al. 2014; Ramírez-Avilés et al. 2019). Respuestas similares se han reportado en condiciones de zona templada (Ford et al. 2019).

La búsqueda de alternativas que reduzcan las aplicaciones de altas dosis de fertilizantes químicos y enmiendas orgánicas para aumentar la productividad de los pastos está siendo un tema clave de investigación, por el impacto negativo del uso excesivo de fertilizantes químicos en la contaminación de suelos y aguas subterráneas (Rodríguez-Eugenio et al. 2019). En este contexto, uno de los recursos biológicos que puede contribuir a mejorar los sistemas de producción ganadera basados en el uso de pasturas asociadas es el manejo eficiente de los microorganismos rizosféricos, aplicados en forma de inoculantes (González et al. 2017).

La fijación biológica de nitrógeno a través de la simbiosis rizobio-leguminosa tiene implicaciones económicas y ambientales directas, debido a la disminución en el uso de fertilizantes nitrogenados (Martínez-Viera y Dibut 2012), ya que en algunos casos la fijación simbiótica es capaz de abastecer hasta el 90% de las necesidades de nitrógeno de las plantas

(López-Alcócer et al. 2020). Al establecer asociaciones entre ambos grupos de plantas, es posible incrementar la producción de biomasa y mejorar el contenido nutricional de la pradera (Guerra-Guzmán et al. 2021), constituyendo una alternativa para la sustitución de fertilizantes nitrogenados y la mejora de la dieta de los animales (Santos et al. 2011).

La aplicación de inoculantes a base de rizobios estimula la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico en las leguminosas y, en el caso de los cultivos forrajeros, puede contribuir significativamente a incrementar su potencial productivo y a mejorar el balance de este nutriente en los pastizales (Carvalho y Pires 2008; Guzmán y Montero 2021). Por otro lado, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) habitan de forma natural en la rizosfera en simbiosis con las plantas forrajeras y desempeñan un papel clave en la mejora de la capacidad de absorción de nutrientes y agua (Tao Zhang et al. 2012; Quiñones-Aguilar et al. 2019). En aquellos casos donde las comunidades residentes de HMA no son capaces de establecer una asociación efectiva con los pastos, la introducción de cepas eficientes ha ayudado a promover el crecimiento (González et al. 2015; Ojeda-Quintana et al. 2020).

Algunos estudios muestran que la inoculación con HMA no solo favorece el crecimiento de las plantas inoculadas, sino también de las demás plantas asociadas a ellas (Tajini et al. 2012). En asociaciones de gramíneas con leguminosas co-inoculadas con HMA y rizobios, las gramíneas también pueden ser colonizadas por los HMA inoculados a la leguminosa, y así incrementar su capacidad para absorber nutrientes a través de las hifas del hongo, incluyendo el nitrógeno liberado por la descomposición de los nódulos de las leguminosas asociadas (Crespo-Flores 2016).

La asociación de gramíneas con leguminosas y su inoculación con HMA y aislados locales de rizobios puede contribuir a incrementar el crecimiento de

las gramíneas (Crespo-Flores 2016) y favorecer la producción de pigmentos fotosintéticos en algunas especies de gramíneas asociadas, además de promover el desarrollo de estructuras micorrízicas y la nodulación.

Teniendo en cuenta trabajos previos, este estudio se realizó para evaluar, en condiciones de invernadero, el efecto de la co-inoculación de *Leucaena leucocephala* con *Claroideoglomus claroideum* y el aislado R3 de rizobio sobre las estructuras micorrízicas, la concentración de pigmentos fotosintéticos, el crecimiento y la producción de biomasa de las gramíneas *Bouteloua gracilis*, *Bouteloua curtipendula* y *Setaria macrostachya* que crecían solas y en asociación con *Leucaena leucocephala*.

Materiales y Métodos

Condiciones experimentales

En la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (México), se realizaron tres experimentos en condiciones semicontroladas. Para el crecimiento de las plantas se utilizó un sustrato compuesto por una mezcla de suelo procedente de una zona agrícola cercana al sitio experimental y arena de río en proporción 1:1 v:v, con el cual se llenaron bolsas de plástico de 35 × 35 cm de ancho y largo para un volumen total de 5 kg de suelo. Antes del llenado de las bolsas se tomaron 10 muestras para el análisis químico del sustrato preparado, los resultados obtenidos fueron los siguientes: 35 (SE±: 0.07), 66.3 (SE±: 0.06), 3300 (SE±: 2.36) y 540 (SE±: 0.47) mg/kg para P, K, Ca y Mg respectivamente; 1.92% de materia orgánica (MO) y un pH=6.9. Los métodos utilizados para determinar estos valores fueron los siguientes: pH (H₂O) por potenciometría (proporción 1: 2.5, suelo: agua) (NC ISO 10390 1999), materia orgánica por el método de Walkley and Black (NC 51 1999), fósforo (P) asimilable por el método de extracción con H₂SO₄ 0.05 mol/L, Ca y Mg por complexometría y Na y K por fotometría de llama (NC 51 1999).

De acuerdo con los valores del análisis químico, el sustrato presentó bajas concentraciones de K y MO, altos valores de P asimilable, Ca y Mg, un porcentaje aceptable de Na y un pH cercano a la neutralidad (NC 52 1999). El sustrato presentó un promedio de 140 esporas de HMA en una muestra de 50 g. Durante todo el periodo experimental (17 de septiembre de 2020 al 04 de junio de 2021) se registró una temperatura media de 20.62 °C y 50.43% de humedad relativa, medidos con

un registrador de temperatura HOBO Onset U23-001A colocado junto a las plantas usadas en el experimento.

Diseño experimental

El estudio consistió en tres experimentos independientes con cada una de las siguientes especies de gramíneas: *Bouteloua gracilis* (Kunth) Griffiths (Navajita), *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. (Banderita) y *Setaria macrostachya* Kunth (Tempranero). En cada experimento se evaluaron tres tratamientos: (1) gramínea sola; (2) gramínea asociada con *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (leucaena, guaje) sin inocular; y (3) gramínea asociada con *L. leucocephala* co-inoculada con una cepa de HMA y un aislado de rizobio.

Los tratamientos se distribuyeron según un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por las bolsas de 35.0 × 35.0 cm de ancho y largo, respectivamente, las cuales contenían tres plantas, en el tratamiento de gramínea no asociada, y tres plantas de gramínea más una de *L. leucocephala*, en los tratamientos donde se asociaron las especies de ambas familias.

Inoculantes empleados

El inoculante de HMA [*Claroideoglomus claroideum* (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler] utilizado en los experimentos fue aislado de una parcela en una zona agrícola productora de maní (*Arachis hypogaea*) en Ciudad Fernández, SLP, México (22° 00'47.36" N y 100° 21'14.66" W). El inoculante se preparó a partir de esporas extraídas de inóculos previamente multiplicados sobre un sustrato arcilloso esterilizado previamente en autoclave a 120 °C, durante una hora por tres días consecutivos. La especie *Sorghum vulgare* se usó como cultivo trampa.

El aislado de rizobio utilizado en los experimentos fue obtenido de muestras de raíces de *L. leucocephala* recolectadas en un área ubicada en la localidad de Tocoy del municipio de San Antonio, San Luis Potosí (21° 38'19.0"N 98° 52'15.0"W) (Crespo-Flores 2021). El cultivo de células de rizobio se preparó en medio líquido Levadura-Manitol-Agar (LMA) a 28 °C y en condiciones de agitación, durante 24-30 horas (Vincent 1970).

Ambas cepas inoculantes, identificadas como AMF2 y R3, en el caso del HMA y el rizobio respectivamente, fueron seleccionadas para su aplicación en este estudio, dado que en un estudio previo (Crespo-Flores et al. 2022) se demostró que presentaban una mayor efectividad en

la promoción de estructuras micorrízicas, nodulación, crecimiento y producción de biomasa de plántulas de *L. leucocephala* y *Prosopis laevigata*.

Propagación de plantas y aplicación de inoculantes

Las plantas de gramíneas se propagaron por semillas. Las semillas se colocaron en bandejas de germinación de 200 cavidades con musgo de turbera ("peat moss") como sustrato. Previo a la germinación, las semillas se desinfectaron sumergiéndolas durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 10%; posteriormente se enjuagaron con agua destilada. Cuando las plántulas alcanzaron una altura entre 6 y 7 cm, se trasplantaron a las bolsas que contenían el sustrato previamente preparado.

Las plantas de *L. leucocephala* se propagaron por semilla. Las semillas se escarificaron en agua a 80 °C por dos minutos, luego se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% por tres minutos, seguidamente se colocaron en bandejas germinadoras con 200 cavidades que contenían turba como sustrato. Cuando las plántulas alcanzaron entre 5 y 8 cm de altura, se trasplantaron a las bolsas que contenían las gramíneas trasplantadas 30 días antes. Las plantas de *L. leucocephala* junto con las gramíneas se cultivaron durante 259 días (del 17 de septiembre de 2020 al 04 de junio de 2021). Durante ese período se aplicó la misma cantidad de agua a cada unidad experimental en días alternos o de acuerdo con las necesidades de las plantas.

La inoculación de HMA se realizó aplicando 0,5 ml de solución de Ringer (7.5 g de NaCl, 0.75 g de KCl, 0.1 g de CaCl₂ y 0.1 g de NaHCO₃ en 1 L de H₂O) que contenía 60 esporas extraídas del inóculo. En el caso del aislado de rizobio (R3), se aplicó 1 ml del inóculo al sustrato. Cada ml de inóculo contenía 10⁸ CFU. Ambos inoculantes se aplicaron directamente alrededor de las raíces de las plántulas de *L. leucocephala*, al momento del trasplante.

Evaluación de las variables de crecimiento

El crecimiento de las gramíneas se evaluó en cuatro cortes, el primero a los 42 días después del trasplante (ddt) de *L. leucocephala*, y luego a los 176, 224 y 259 ddt, respectivamente. En cada corte se determinó el número de tallos y la masa seca (MS) por maceta de la parte aérea de las gramíneas. Al final del experimento se determinó de forma independiente la MS de las raíces para cada una de las gramíneas y de *L. leucocephala*. Para obtener la MS, las muestras se colocaron en la

estufa a 70 °C hasta alcanzar peso constante. El peso de MS se registró en una balanza SCS Precisa LS320M, con precisión de 1 mg. La MS total acumulada se determinó sumando los cuatro cortes.

Evaluación de las variables fúngicas de los HMA y de la nodulación

La colonización de micorrizas se determinó al final del experimento en las raíces de las plantas previamente lavadas con agua corriente y secadas al aire. Para las determinaciones se pesaron aproximadamente 200 mg de raicillas, las cuales fueron secadas a 70 °C, y teñidas según la metodología descrita por Phillips y Hayman (1970). La frecuencia de colonización micorrízica, que expresa el grado de ocupación de las raíces por HMA, se evaluó por el método de los interceptos (Giovannetti y Mosse 1980). La densidad visual o intensidad de la colonización se estimó según Trouvelot et al. (1986). La cuantificación del número de esporas (esporas/50 g) se realizó a partir de muestras de 50 g de sustrato de las bolsas, extrayéndose dichas estructuras por tamizado húmedo y decantación y observación posterior al microscopio (Herrera et al. 1995).

El número de nódulos totales y su efectividad se evaluó según lo indicado en FAO (1985). Para ello, se extrajeron las raíces de *L. leucocephala* de la bolsa, separándolas del sustrato y lavándolas con agua corriente. Una vez limpias las raíces se cuantificaron los nódulos totales y se determinó su efectividad observando la coloración interna a través de un corte transversal del nódulo. Los nódulos que presentaron coloración de rojo a rosa fueron considerados como nódulos efectivos por presencia de leghemoglobina, mientras que los blancos fueron considerados como nódulos jóvenes (no efectivos).

Evaluación de la concentración de pigmentos fotosintéticos en los pastos

La concentración de pigmentos (clorofilas *a* y *b*, clorofilas totales y carotenoides) se evaluó en muestras frescas de hojas de las gramíneas. Para el análisis de pigmentos se seleccionó la cuarta hoja completamente expandida (Silva et al. 2001). El total de muestras se recolectó entre las 9:00 y 10:00 a.m. para evitar variaciones relacionadas al tiempo de muestreo. Para determinar la concentración de los pigmentos se tomaron 80 mg de cada muestra y se colocaron en frascos de vidrio color ámbar con 2 ml de N, N-dimetilformamida (Inskip y Bloom 1985). Los

frascos se cubrieron previamente con papel de aluminio para bloquear la translucidez y reducir la desnaturalización de los pigmentos, y luego se dejaron a 4 °C durante 72 h (Inskeep y Bloom 1985). Posteriormente, se registró la absorbancia a las longitudes de onda de 667, 645 y 480 nm, utilizando un espectrofotómetro (AGILENT 8453). Las concentraciones de clorofilas *a* y *b*, clorofilas totales y carotenoides se calcularon utilizando las fórmulas descritas por Minocha et al. (2009).

Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó mediante el programa estadístico IBM SPSS Statistics 25 para Windows (SPSS 2017). Los datos se evaluaron mediante análisis de varianza de clasificación simple. Los análisis se realizaron por separado para cada experimento, con cada una de las tres especies de gramíneas asociadas, con o sin *L. leucocephala*. El mismo criterio se aplicó para el análisis de los efectos de tratamientos en las diferentes fechas de corte. En los casos en que hubo un efecto significativo de los tratamientos, se utilizó

la prueba de comparación múltiple de Duncan para establecer las diferencias entre las medias; mientras que en el caso de comparaciones entre solo dos grupos de datos, se utilizó la prueba t de Student para dos grupos (Gómez y Gómez 1984).

Resultados

Biomasa aérea

El número de tallos de las gramíneas se vio afectado significativamente por los tratamientos ($P < 0.05$). En el segundo, tercero y cuarto corte, se constató que *B. gracilis* y *B. curtipendula* presentaron mayor número de tallos creciendo solas o en asocio con *L. leucocephala* co-inoculada que cuando se asociaron con *L. leucocephala* sin inocular. En el caso de *S. macrostachya*, solo en el tercer y cuarto corte el número de tallos fue superior cuando creció en monocultivo o en asocio con *L. leucocephala* co-inoculada, con respecto a su asocio con *L. leucocephala* sin inocular (Figura 1).

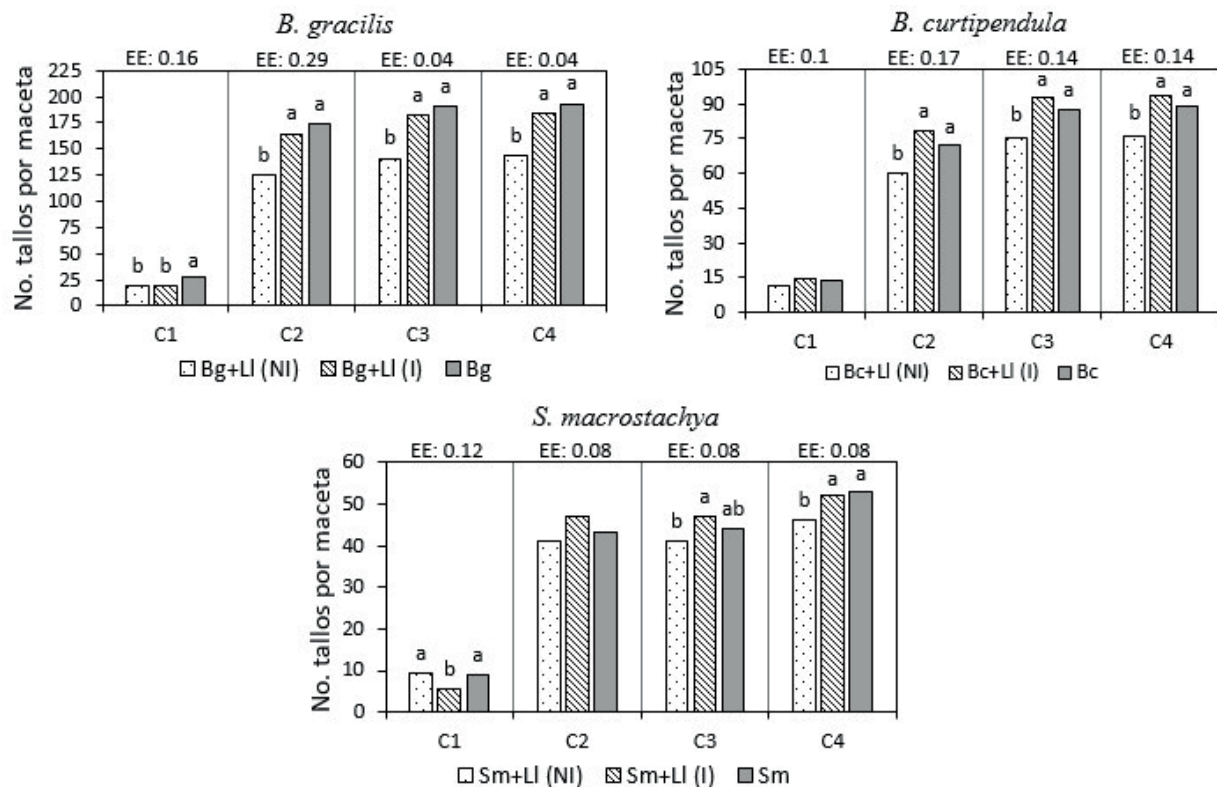


Figura 1. Efecto de la co-inoculación de *L. leucocephala* con *C. claroideum* y con el aislado de rizobio (R3) en el número de tallos de *B. gracilis* (Bg), *B. curtipendula* (Bc) y *S. macrostachya* (Sm). Donde: C1, C2, C3 y C4 representan cada corte. NI (no inoculado), I (inoculado), *L. leucocephala* (Ll). EE = error estándar; $n = 4$. ^{ab} Los valores con letras diferentes dentro de cada corte indican diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos, según la prueba de Duncan.

La producción de biomasa aérea de las gramíneas también mostró diferencias debidas a tratamientos ($P < 0.05$), comportándose de manera similar al número de tallos, principalmente en *B. gracilis* y *B. curtipendula*. En todos los cortes, excepto en el primero, las gramíneas produjeron mayor cantidad de biomasa cuando se asociaron con *L. leucocephala* co-inoculada o cuando crecieron solas. En todos los casos, los pastos combinados con *L. leucocephala* sin inocular tuvieron la menor cantidad de biomasa. En el último corte, las plantas de *B. gracilis* y *B. curtipendula* sin asociar superaron los rendimientos de masa seca (MS) de las gramíneas asociadas a *L. leucocephala* co-inoculada, y estas,

a su vez, siguieron siendo superiores a las asociadas con leucaena no inoculada (Figura 2).

Solo en *B. gracilis* y *B. curtipendula* se observaron diferencias ($P < 0.05$) debidas a tratamientos en cuanto al acumulado de biomasa seca en los cuatro cortes, no así en el caso de *S. macrostachya* (Figura 3). Cuando cada una de las especies de gramíneas se asoció con *L. leucocephala*, los tratamientos de co-inoculación produjeron una mayor cantidad de biomasa aérea que aquellos sin inoculación. A su vez, las gramíneas que no se asociaron con *L. leucocephala* tuvieron una tendencia a producir mayor biomasa que las gramíneas asociadas con y sin inoculación, aunque solo en *B. gracilis* se detectó diferencia significativa ($P < 0.05$) (Figure 3).

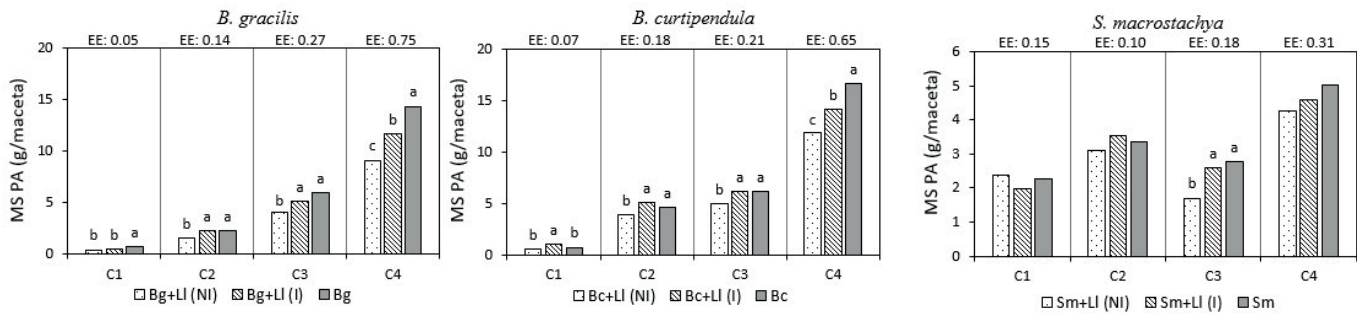


Figura 2. Efecto de la co-inoculación de *L. leucocephala* con *C. claroidium* y con el aislado de rizobio (R3) en la producción de biomasa aérea (MS PA) en cada corte de *B. gracilis* (Bg), *B. curtipendula* (Bc) y *S. macrostachya* (Sm). Donde: C1, C2, C3 y C4 representan cada corte. NI (no inoculado), I (inoculado), L. leucocephala (L). EE = error estándar; $n = 4$. ^{ab} Los valores con letras diferentes dentro de cada corte indican diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos, según la prueba de Duncan.

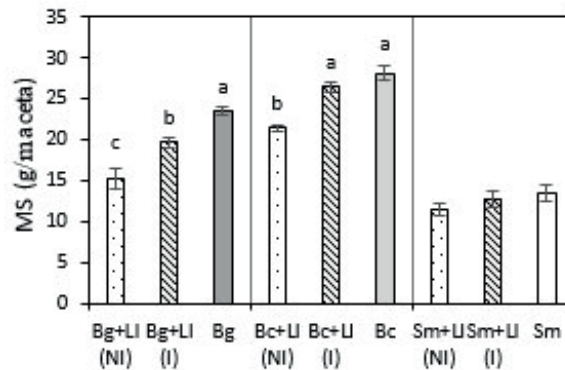


Figura 3. Efecto de la asociación con *L. leucocephala* y su co-inoculación con *C. claroidium* y el aislado de rizobio R3 sobre la producción de biomasa aérea de gramíneas (MS, g/maceta) acumulada en los cuatro cortes. Donde: *B. gracilis* (Bg), *B. curtipendula* (Bc), *S. macrostachya* (Sm), *L. leucocephala* (L). MS PA (Masa seca de la parte aérea de los pastos). NI (no inoculado), I (inoculado). Las barras (F) superpuestas representan el error estándar de las medias de tratamiento; $n = 4$. ^{abc} Los valores con letras diferentes en cada corte difieren ($P < 0.05$) según la prueba de Duncan.

Biomasa radicular

Los promedios de biomasa de las raíces de las gramíneas y de *L. leucocephala* no mostraron diferencias ($P > 0.05$) debidas a tratamientos (Figuras 4A y 4B). Por otro lado, se observó que la masa seca de las raíces de *L. leucocephala* asociada a *S. macrostachya* alcanzó valores muy superiores con respecto a la leucaena asociada a las otras gramíneas, es decir una diferencia de entre 64 % y 68% respecto al asocio con *B. gracilis* y 70% a 72% respecto al asocio con *B. curtipendula*. En correspondencia con lo anterior, la Figura 4B muestra que la biomasa de raíces (g MS/maceta) de *S. macrostachya* fue menor a la de *B. curtipendula* y *B. gracilis*, en ese orden.

No se detectó diferencias en la biomasa total de las raíces (gramíneas + *L. leucocephala*) debidas a los tratamientos cuando las gramíneas asociadas fueron *B. gracilis* y *B. curtipendula*. En contraste, la asociación de *S. macrostachya* con *L. leucocephala* co-inoculada o sin inocular promovió hasta tres veces más producción de biomasa de raíces de cuando se consideraron ambas especies (Figura 4C).

Variables fúngicas y de nodulación

Los tratamientos estudiados generaron efectos significativos ($P < 0.001$) sobre las variables que caracterizan las estructuras micorrízicas asociadas a la rizosfera de las especies de gramíneas y *L. leucocephala*. El mayor número de esporas se presentó en los tratamientos co-inoculados en cada asociación de gramíneas con *L. leucocephala*. También se encontraron esporas en el tratamiento de la asociación con *L. leucocephala* sin inocular, así como en las gramíneas no asociadas, obteniendo un mayor número en las asociaciones leguminosa-gramíneas que en las gramíneas solas (Figura 5A). Los indicadores de colonización micorrízica y densidad visual se comportaron de manera similar al número de esporas, donde los mayores porcentajes se alcanzaron en los tratamientos de asociación co-inoculada, seguidos de las asociaciones sin inocular y las gramíneas solas (Figura 5B y 5C).

El número de nódulos en las raíces de las plantas de *L. leucocephala* fue mayor ($P < 0.05$) en las plantas co-inoculadas respecto a las no inoculadas, cuando se asociaron con *B. gracilis* y *S. macrostachya*

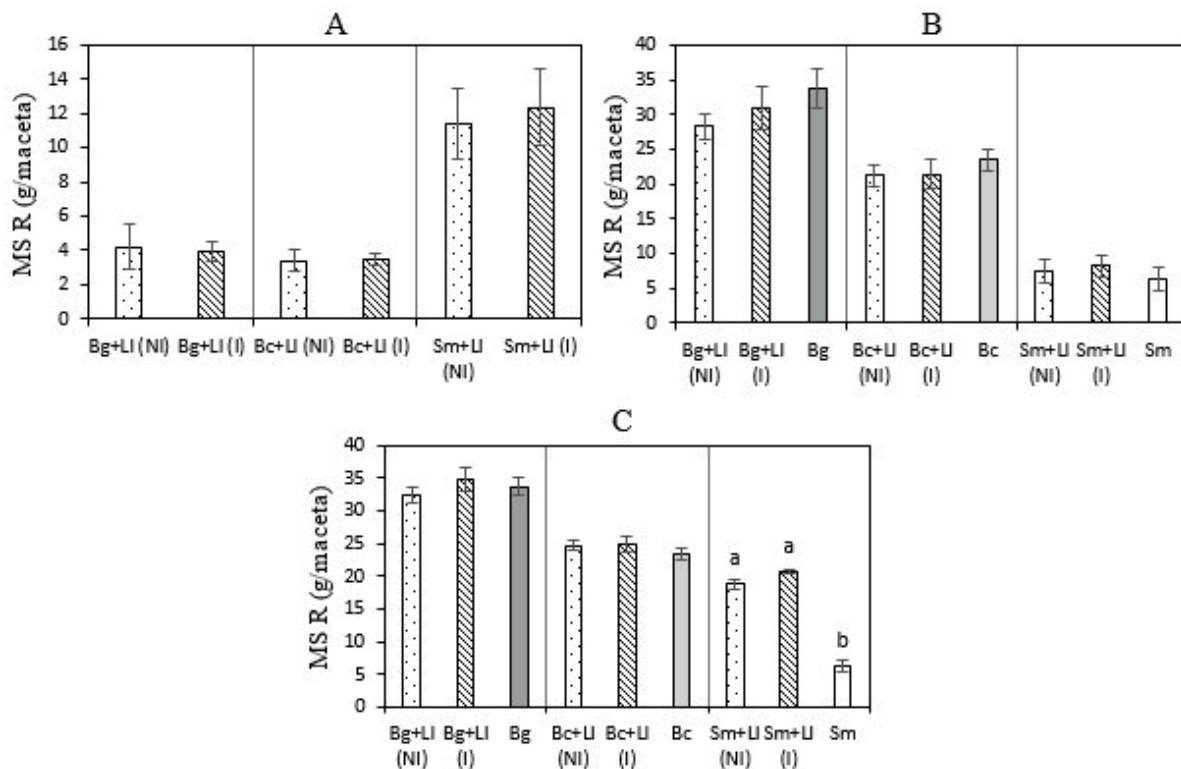


Figura 4. Efecto de la asociación con *L. leucocephala* y su co-inoculación con *C. claroideum* y el aislado de rizobio R3 sobre la producción total de biomasa radical (MS R, g/maceta) en *L. leucocephala* (A), en las gramíneas (B) y en gramíneas + *L. leucocephala* (C). Donde: *B. gracilis* (Bg), *B. curtipendula* (Bc), *S. macrostachya* (Sm), *L. leucocephala* (LI). NI (no inoculado), I (inoculado). Las barras (F) superpuestas representan el error estándar de las medias de tratamiento; $n = 4$. ^{ab} Los valores con letras diferentes en cada corte difieren ($P < 0.05$) según la prueba de Duncan.

(Figura 6A); en cambio, las plantas de *L. leucocephala* co-inoculadas asociadas con *B. curtipendula* no aumentaron significativamente el número de nódulos en comparación con las plantas sin inocular. Por otro lado, la efectividad de los nódulos no mostró diferencias ($P > 0.05$) debidas a la inoculación, en el caso de los asociados con las tres especies de gramíneas evaluadas (Figura 6A y 6B).

Concentración de pigmentos fotosintéticos en las gramíneas

La concentración de pigmentos fotosintéticos en las hojas de las gramíneas mostró diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos en al menos dos de las especies de gramíneas. La clorofila *b* fue más abundante cuando se asoció *B. gracilis* con *L. leucocephala* co-inoculada en comparación con el

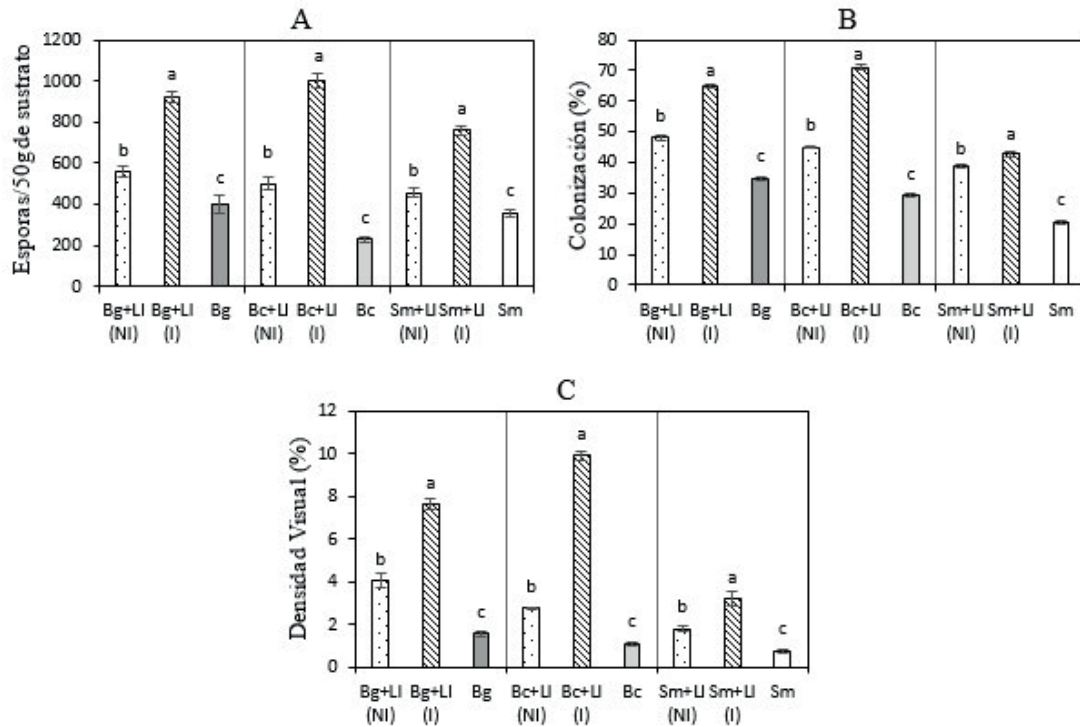


Figura 5. Efecto de la asociación con *L. leucocephala* y su co-inoculación con *C. claroideum* y el aislado R3 sobre el contenido de esporas de HMA (A) y los porcentajes de colonización (B) y densidad visual (C) en la rizosfera y raíces de cada especie de gramínea. Donde: *B. gracilis* (Bg), *B. curtipendula* (Bc), *S. macrostachya* (Sm) y *L. leucocephala* (LI). NI (no inoculada), I (inoculada). Las barras (E) superpuestas representan el error estándar de las medias de tratamiento; $n = 4$. ^{abc} Los valores con letras diferentes en cada corte difieren ($P < 0.05$) según la prueba de Duncan.

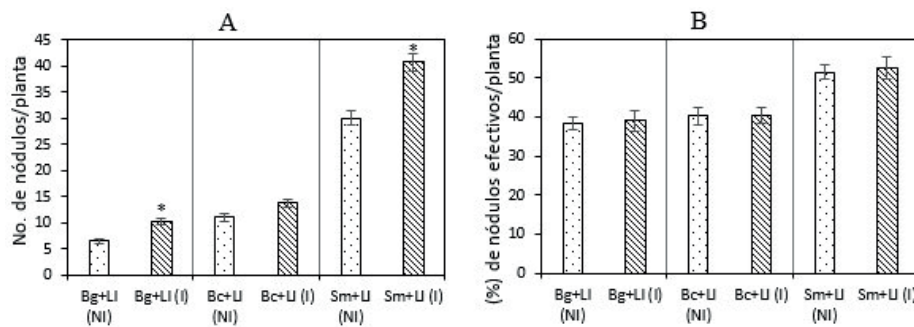


Figura 6. Efecto de la asociación con *L. leucocephala* y su co-inoculación con *C. claroideum* y el aislado R3 en el número de nódulos (A) y el porcentaje de nódulos efectivos (B) en *L. leucocephala* (LI) asociada con cada especie de gramínea. Donde: *B. gracilis* (Bg), *B. curtipendula* (Bc), *S. macrostachya* (Sm). NI (no inoculado), I (inoculado). Las barras (E) superpuestas representan el error estándar de las medias de tratamiento; $n = 4$. *Diferencia significativa ($P < 0.05$) según la prueba t de Student.

tratamiento de asociación sin inocular y solo pastos; sin embargo, eso no resultó en diferencias para clorofilas totales (clorofila *a* + clorofila *b*) ni carotenoides totales (Figura 7). Al asociar *S. macrostachya* con *L. leucocephala*, las plantas de la gramínea presentaron mayor concentración de clorofilas *a* y *b* en sus hojas en comparación con las que no se asociaron con la leguminosa, independientemente de la presencia o no de co-inoculación. En cambio, en el asocio con *B. curtipendula*, los tratamientos de inoculación o co-inoculación de *L. leucocephala* no afectaron ($P > 0.05$) las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en la gramínea (Figura 7).

Discusión

Evaluación del crecimiento de las gramíneas

La inoculación de *L. leucocephala* con rizobio y HMA favoreció el crecimiento de las tres especies de gramíneas procedentes de climas semiáridos, respecto al tratamiento con la leguminosa sin inocular (Figuras 1 y 2). Crespo-Flores (2016) obtuvo resultados similares en un ambiente cálido-húmedo, trabajando con *Brachiaria decumbens* asociada a *Stylosanthes guianensis* co-inoculado con dos aislamientos de rizobio y el hongo *Funneliformis mosseae*.

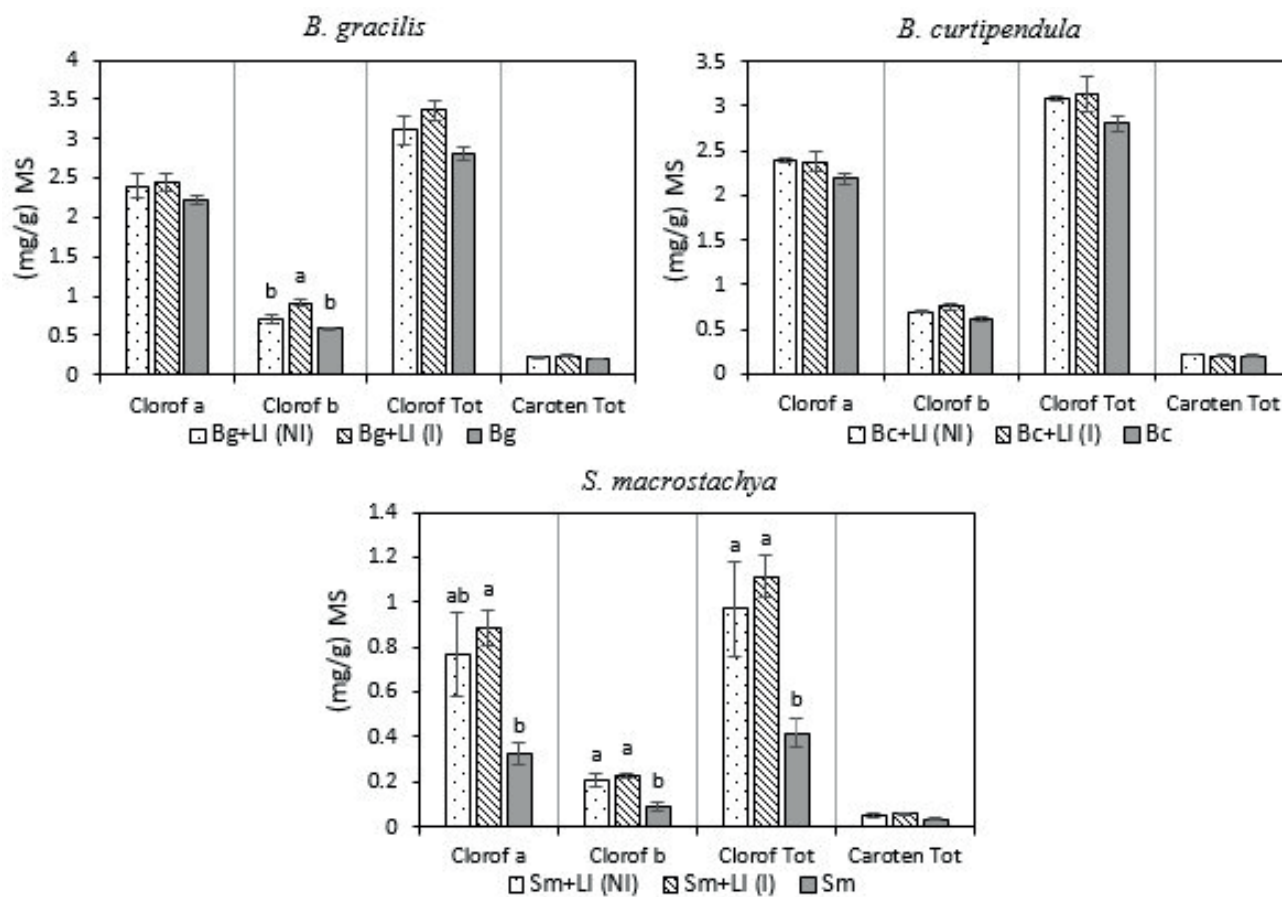


Figura 7. Efecto de la co-inoculación con *C. claroideum* y el aislado R3 en *L. leucocephala* (LI) sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos (Clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas y carotenoides totales) en *B. gracilis* (Bg), *B. curtipendula* (Bc) y *S. macrostachya* (Sm). Donde: NI (no inoculado), I (inoculado). Las barras (F) superpuestas representan el error estándar de las medias de tratamiento; $n = 4$. ^{ab} Los valores con letras diferentes en cada corte difieren ($P < 0.05$) según la prueba de Duncan.

Otros trabajos demuestran el beneficio que reciben algunas plantas al crecer junto a otras que han sido micorrizadas ([Tajini et al. 2012](#)). Al explorar el sustrato en busca de nutrientes, las hifas de la cepa del hongo *C. claroideum* pueden haber colonizado las raíces de las gramíneas y establecido una relación simbiótica con estas, y de esa manera contribuido a mejorar su nutrición y absorción de agua. Así, es probable que esta mejora en la nutrición trajera consigo un aumento en el crecimiento de las gramíneas asociadas.

Las gramíneas no asociadas produjeron un número de tallos y cantidad de biomasa similar a las gramíneas asociadas a *L. leucocephala* co-inoculada, e incluso, en el último corte, produjeron mayor cantidad de biomasa en *B. gracilis* y *B. curtipendula*. Este resultado contrasta con lo obtenido en otros estudios, donde se observó una mejora en el crecimiento de las gramíneas cuando se asociaban con otras leguminosas ([Bolívar et al. 1999](#)). En el caso de este trabajo, la diferencia podría deberse al tamaño reducido de las bolsas (35.0 × 35.0 cm), por el cual las gramíneas asociadas con *L. leucocephala* estuvieron sometidas a una mayor competencia por espacio y recursos (nutrientes, agua e incluso luz), con respecto a las gramíneas solas.

En los tratamientos de asociación se tuvo cuatro plantas por bolsa, tres de gramínea y una de *L. leucocephala*, a diferencia de solo tres plantas de gramíneas en los tratamientos sin asociación. Esto pudo haber representado una ventaja para el tratamiento de gramíneas no asociadas *versus* las asociadas, en cuanto a la disponibilidad de recursos en el mismo volumen de sustrato, y estos tendieron a volverse más limitante a medida aumentaba el volumen de las raíces (Figura 4). Además, en las gramíneas asociadas, la competencia por luz de estas con *L. leucocephala* debe haber sido también cada vez mayor hasta el momento en que las gramíneas alcanzaron un tamaño similar a la leguminosa; pero, la co-inoculación aplicada a *L. leucocephala* posiblemente les permitió a las gramíneas reducir las desventajas provocadas por la competencia, con respecto a las gramíneas que crecieron solas.

Los resultados indican que la co-inoculación de *L. leucocephala* con HMA y el aislado de rizobio estimuló la producción de biomasa en las tres especies de gramíneas (*B. gracilis*, *B. curtipendula* y *S. macrostachya*) cultivadas en asociación. Esto demuestra que las gramíneas se vieron favorecidas por la colonización de la cepa de *C. claroideum*,

inoculada en *L. leucocephala*, lo cual se relaciona con los mayores porcentajes de colonización y densidad visual encontrados en sus raíces con respecto a los tratamientos sin inocular (Figuras 5B y 5C). Por otra parte, si bien se detectó diferencias en la efectividad de los nódulos en los tratamientos de inoculación respecto a los no inoculados, es posible que el nitrógeno que pudo estar presente en el sustrato haya sido transferido con mayor eficiencia a las raíces de los pastos gracias a la cepa de HMA inoculada. En este sentido, existen varios reportes sobre la contribución de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) a la nutrición nitrogenada de las especies acompañantes ([López-Alcócer et al. 2020](#); [Zúñiga-Estrada et al. 2022](#)), y el efecto sinérgico entre los HMA y los microorganismos que ejercen FBN ([Harris et al. 2019](#); [Delgado-Álvarez et al. 2023](#)).

Variables fúngicas y de nodulación

En este estudio se comprobó que la presencia de *C. claroideum* aumentó los niveles de ocupación (% colonización y % de densidad visual) en las raíces de las plantas y el número de esporas en su rizosfera (Figura 5). Esto demostró que, bajo las condiciones de este estudio, la cepa inoculada fue más efectiva para colonizar las raíces de las plantas con respecto a las que estaban presentes en el sustrato. Por otra parte, la presencia de una cepa seleccionada de rizobio también puede haber favorecido la efectividad de la micorrización, teniendo en cuenta que la interacción entre ambos microorganismos en simbiosis con la planta aporta recursos que favorecen su funcionamiento. Esto corrobora lo encontrado en otros estudios que indican que la inoculación simple o combinada de cepas efectivas de HMA y rizobios incrementa las estructuras del hongo en las raíces y rizosfera de las plantas, tanto en las inoculadas ([Tamayo-Aguilar et al. 2021](#)) como las asociadas ([Tajini y Drevon 2012](#)).

En este sentido, la introducción de especies seleccionadas de HMA es una opción a considerar, especialmente en los casos en que los HMA residentes no produzcan los beneficios deseados, debido a su baja efectividad ([Oliveira et al. 2014](#); [González et al. 2016](#)). Asimismo, en el caso de las leguminosas, se recomienda la inoculación combinada de cepas de HMA y rizobios, por la potenciación de los efectos que se producen en esta interacción tripartita, lo que repercute favorablemente en el rendimiento de la leguminosa ([Martín et al. 2015](#)).

El número de nódulos en raíces de *L. leucocephala* fue influenciado por la co-inoculación, sin embargo, no se observó diferencias entre tratamientos en el porcentaje de nódulos efectivos (Figura 6). Aparentemente, la presencia del aislado R3 en este experimento no tuvo el mismo éxito logrado en un experimento anterior, en el que se comprobó la efectividad de la inoculación simple y combinada de tres aislados de rizobio y dos cepas de HMA en *L. leucocephala* (Crespo-Flores et al. 2022). Esta situación pudo haber sido producto de la incidencia de algún otro factor, como el hecho que si bien la leucaena fue trasplantada y coinoculada en idénticas condiciones de sustrato y con la misma altura de las plantas que en el experimento antes citado (Crespo-Flores et al. 2022), en este ensayo el trasplante se realizó muy cerca de las gramíneas que ya tenían 30 días de plantadas.

Por otro lado, el mayor número de nódulos encontrados en los tratamientos co-inoculados puede deberse a que la cepa de HMA introducida también favoreció la simbiosis de *L. leucocephala* con los rizobios residentes en el sustrato, aunque los nódulos producidos por estos no mostraron un alto porcentaje de efectividad. Esto confirma lo planteado por varios autores (Rabie et al. 2005; Toro et al. 2008; Lara et al. 2019) sobre la interacción tripartita rizobio-leguminosa-HMA, en la que se favorece el desarrollo de cada organismo de forma individual y en su conjunto. Cabe anotar que algunos autores consideran que, si el mayor número de nódulos presentes en las raíces proviene de la colonización de la población alóctona del suelo, la tasa de fijación de N₂ y el número de nódulos efectivos vendrán determinados por la efectividad de dicha población, la cual es generalmente baja (Lodeiro 2015).

Concentración de pigmentos fotosintéticos en los pastos

En el presente estudio se observó que las concentraciones de clorofila *a* y *b* en *S. macrostachya* estuvieron afectadas por los tratamientos. Aunque en las gramíneas asociadas con *L. leucocephala* co-inoculada hubo cierta tendencia a presentar mayores contenidos de estas clorofilas, la diferencia no fue significativa ($P < 0.05$) con respecto a las gramíneas asociadas con *L. leucocephala* no inoculada. Sin embargo, la influencia de *L. leucocephala* se reflejó en las gramíneas asociadas con respecto a las que crecieron solas (Figura 7C). Esto último fue más evidente en de *S. macrostachya* asociada con *L. leucocephala*, lo que sugiere que esta leguminosa

fue más efectiva en su simbiosis con rizobios cuando estuvo asociada a esa gramínea (Figura 6).

Otros estudios han reportado que la inoculación con HMA aumenta la concentración de pigmentos fotosintéticos en las hojas de algunas especies (Manjarrez-Martínez et al. 2005; Chiquito-Contreras et al. 2018). Sin embargo, en algunos cultivos como los pastos, la concentración de pigmentos fotosintéticos también puede variar según la edad del cultivo y de sus rebrotes, siendo insuficiente la influencia de la inoculación en algunas etapas (Díaz y Garza 2006).

Los resultados del presente estudio parecen indicar que la influencia de *L. leucocephala* sobre las concentraciones de clorofilas *a* y *b* en las gramíneas asociadas podría estar relacionada con la existencia de nitrógeno fijado en la leguminosa, lo que favorece en cierta medida el aporte de nitrógeno a las plantas asociadas, en este caso las gramíneas, ya sea por la proximidad de sus raíces o por su conexión a través de las hifas de los HMA (Tajini et al. 2012).

Lo anterior parece apoyar lo planteado por Casierra-Posada et al. (2012), quienes consideran que uno de los indicadores de la capacidad fotosintética de las plantas es la cantidad de clorofila en las hojas, lo cual incide en la eficiencia del proceso fotosintético. Por otro lado, Demotes et al. (2008) y Sánchez et al. (2018) sugieren que el contenido de clorofila también puede indicar el estado nutricional de la planta en términos de nitrógeno, el cual es un elemento crucial en la síntesis de proteínas fotosintéticas.

Se recomienda validar los resultados del presente estudio en experimentos de campo, para así obtener una mejor comprensión de las interacciones que ocurren entre especies de gramíneas, leguminosas y microorganismos rizosféricos en un ambiente natural; ya que en este estudio hubo un buen control de varios factores bióticos y abióticos, gracias a que las plantas se manejaron en bolsas, bajo condiciones de invernadero.

Conclusiones

La co-inoculación de *L. leucocephala* con *C. claroideum* y el aislado local de rizobio (R3) promueve el desarrollo de estructuras micorrízicas y un mayor número de nódulos en *L. leucocephala*, lo cual a su vez favorece el crecimiento de las gramíneas *B. gracilis*, *B. curtipendula* y *S. macrostachya*, asociadas con ella. La co-inoculación con estas cepas, permite que *B. gracilis* y *B. curtipendula* asociadas a

L. leucocephala reduzcan las desventajas provocadas por la competencia con respecto a las gramíneas cultivadas solas. El crecimiento conjunto de gramíneas y leguminosas promueve la producción de pigmentos fotosintéticos en las gramíneas, lo cual fue más evidente en el asocio de *S. macrostachya* y *L. leucocephala*.

Agradecimientos

Este estudio se realizó con el apoyo de los proyectos: “La asociación simbiótica dual con bacterias nitrofixadoras y hongos micorrízicos para mejorar la producción de leguminosas forrajeras (C18-FAI-05-54.54) y “Fortalecimiento del sistema Jardín Botánico de la UASLP para la conservación y visibilización de la riqueza biocultural y la difusión e intercambio del conocimiento etnobiológico (305045)”, así como la Beca del CONACYT (638999) otorgada para los estudios doctorales del primer autor. Así mismo, se agradece a dos revisores anónimos que con sus comentarios contribuyeron a mejorar el manuscrito.

Referencias

(Nota de los editores: Enlaces verificados el 21 de mayo de 2024).

- Aguilar PC; Solorio SF; Ku VJ; Magaña MJ; Santos FJ. 2019. Producción de leche y carne en sistemas silvopastoriles. *Bioagrociencias* 12(1):1–8. doi: [10.56369/BAC.2911](https://doi.org/10.56369/BAC.2911)
- Bolívar D; Ibrahim M; Kass D; Jiménez F; Camargo JC. 1999. Productividad y calidad forrajera de *Brachiaria humidicola* en monocultivo y en asocio con *Acacia mangium* en un suelo ácido en el trópico húmedo. *Agroforestería en las Américas* 6:48–50. [handle/11554/6726](https://doi.org/10.1515/4dMzEMc)
- Carvalho GGP; Pires AJV. 2008. Leguminosas tropicais herbáceas em associação com pastagens. *Archivos de Zootecnia* 57:103–113. [bit.ly/4dMzEMc](https://doi.org/10.1515/4dMzEMc)
- Casierra-Posada F; Ávila-León OF; Riascos-Ortíz DH. 2012. Cambios diarios del contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de caléndula bajo sol y sombra. *Temas Agrarios* 17(1):60–71. doi: [10.21897/rta.v17i1.697](https://doi.org/10.21897/rta.v17i1.697)
- Chiquito-Contreras RG; Solís-Palacios R; Reyes-Pérez JJ; Murillo-Amador B; Alejandro-Rosas J; Hernández-Montiel LG. 2018. Promoción del crecimiento de plantas de albahaca utilizando hongos micorrízicos arbusculares y una bacteria marina. *Acta Universitaria*. 28(6):68–76. doi: [10.15174/au.2018.2086](https://doi.org/10.15174/au.2018.2086)
- Crespo-Flores G. 2016. Coinoculación de rizobios y hongos micorrízicos arbusculares para el establecimiento de *Stylosanthes guianensis* en asociación con *Brachiaria decumbens*. Tesis de Maestría. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba. [handle/2250/4556118](https://doi.org/10.15174/au.2018.2086)
- Crespo-Flores G. 2021. Co-inoculación con rizobios y hongos micorrízicos arbusculares en leguminosas arbustivas en asociación con zacates. Tesis de Doctorado. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Soledad de Graciano Sánchez, SLP, México.
- Crespo-Flores G; Ramírez-Tobías HM; Pérez MR; Méndez-Cortés H; González-Cañizares PJ. 2022. Co-inoculación con rizobios y hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *Leucaena leucocephala* en etapa de vivero. *Tropical Grasslands-Forrajeras Tropicales*. 10(2):98–108. doi: [10.17138/tgft\(10\)98-108](https://doi.org/10.17138/tgft(10)98-108)
- Delgado-Álvarez A; Martín-Alonso GM; Rivera-Espinosa RA. 2023. Beneficios de la coinoculación de hongos micorrizógenos arbusculares y rizobios en el cultivo del frijol. *Cultivos Tropicales*. 43(3):1–13. [cu-id.com/2050/v43n3e14](https://doi.org/10.17138/tgft(43)1-13)
- Demotes-Mainard S; Boumaza R; Meyer S; Cerovic, ZG. 2008. Indicators of nitrogen status for ornamental woody plants based on optical measurements of leaf epidermal polyphenol and chlorophyll contents. *Scientia Horticulturae* 115(4):377–385. doi: [10.1016/j.scienta.2007.10.006](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.10.006)
- Díaz A; Garza I. 2006. Colonización micorrízica arbuscular y crecimiento de genotipos de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*). *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(3):203–206. [bit.ly/tg-ft](https://doi.org/10.17138/tgft(29)203-206)
- FAO. 1985. Les inoculums de légumineuses et leurs applications. Organisation des Nations Unies pour l’Alimentation et l’Agriculture. Roma, Italie. 63 p.
- Ford MM; Zamora DS; Current D; Magner J; Wyatt G; Walter WD; Vaughan S. 2019. Impact of managed woodland grazing on forage quantity, quality and livestock performance: The potential for silvopasture in Central Minnesota, USA. *Agroforestry Systems* 93(1):67–79. doi: [10.1007/s10457-017-0098-1](https://doi.org/10.1007/s10457-017-0098-1)
- Giovannetti M; Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist* 84(3):489–500. [jstor.org/stable/2432123](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1980.tb02432.x)
- Gómez KA; Gómez AA. 1984. Statistical procedures in agricultural research, 2nd ed. Wiley, New York, USA. 680 p. ISBN: 978-0-471-87092-0
- González PJ; Ramírez JF; Morgan O; Rivera R; Plana R. 2015. Contribución de la inoculación micorrízica arbuscular a la reducción de la fertilización fosfórica en *Brachiaria decumbens*. *Cultivos Tropicales* 36(1):135–142. [bit.ly/4avXNn3](https://doi.org/10.17138/tgft(36)135-142)
- González PJ; Ramírez JF; Rivera R; Hernández A; Crespo G. 2016. Efectividad de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en dos leguminosas forrajeras cultivadas en dos tipos de suelos. *Tropical Grasslands – Forrajeras Tropicales* 4(2):82–90. doi: [10.17138/tgft\(4\)82-90](https://doi.org/10.17138/tgft(4)82-90)
- González PJ; Ramírez JF; Rivera R; Hernández A; Plana R; Crespo-Flores G; Nápoles MC; Hernández-Forte I. 2017. Modelo de suministro de nutrientes para el establecimiento, mantenimiento y recuperación de pastos.

- Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba. 7(1). bit.ly/3wQA6bk
- Guzmán D; Montero J. 2021. Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales 8(2):87–101. doi: [10.53287/uyxf4027gf99e](https://doi.org/10.53287/uyxf4027gf99e)
- Guerra-Guzmán DG; Guevara-Ohara JE; Morazán-Nuñez HJ. 2021. Selección de leguminosas de hábito trepador tipo iv en asocio con maíz para alimentación bovina. Agronomía Costarricense 45 (1):129–141. bit.ly/4bnITSe
- Harris C; Mora E; Palafox M; Pérez CK; Mejía V; Vázquez Y. 2019. Crecimiento de haba en simbiosis con microorganismos nativos de regiones productoras del norte de Puebla, México. Revista Fitotecnia Mexicana 42(3):243–250. bit.ly/4bFZ6B5
- Herrera RA; Ferrer RL; Furrázola E; Orozco MO. 1995. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, Evolución y Procesos sociales. (Eds. Maximina Monasterio). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Subprograma XII. Diversidad Biológica, Mérida. México.
- Inskeep WP; Bloom PR. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. Plant Physiology. 77(2):483–485. doi: [10.1104/pp.77.2.483](https://doi.org/10.1104/pp.77.2.483)
- Lara L; Hernández LG; Reyes JJ; Rangel PP; Zulueta R. 2019. Respuesta agronómica de *Phaseolus vulgaris* a la biofertilización en campo. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(5):1035–1046. doi: [10.29312/remexca.v10i5.936](https://doi.org/10.29312/remexca.v10i5.936)
- Lodeiro AR. 2015. Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. Revista Argentina de Microbiología 47(3):261–273. doi: [10.1016/j.ram.2015.06.006](https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.006)
- López-Alcócer J de J; Lépiz-Ildefonso R; González-Eguiarte DR; Rodríguez-Macías R; López-Alcócer E. 2020. Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* spp. recolectadas en frijol cultivado y silvestre. Terra Latinoamericana 38(4):841–852. doi: [10.28940/terra.v38i4.654](https://doi.org/10.28940/terra.v38i4.654)
- Manjarrez-Martínez MJ; Alarcón A; Ferrera-Cerrato R. 2005. Fertilización foliar en plantas de *Annona cherimola* Mill., inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares. Terra Latinoamericana 23(4):553–562. bit.ly/4bAbnHm
- Martín GM; Reyes R; Ramírez JF. 2015. Coinoculación de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. con *Rhizobium* y hongos micorrízicos arbusculares en dos tipos de suelos de Cuba. Cultivos Tropicales 36(2):22–29. bit.ly/3yAdtZa
- Martínez-Viera R; Dibut AB. 2012. Biofertilizantes bacterianos. Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba. 279 p.
- Minocha R; Martínez G; Lyons B; Long S. 2009. Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species. Canadian Journal of Forest Research 39(4):849–861. doi: [10.1139/X09-015](https://doi.org/10.1139/X09-015)
- NC ISO 10390. 1999. Determinación de pH. Calidad del suelo. Análisis químico. Comité Técnico de Normalización. No. 3. La Habana: Oficina Nacional de Normalización.
- NC 51. 1999. Determinación del por ciento de materia orgánica. Calidad del suelo. Análisis químico. Comité Técnico de Normalización. No. 3. La Habana: Oficina Nacional de Normalización.
- NC 52. 1999. Determinación de las formas móviles de fósforo y potasio. Comité Técnico de Normalización. No. 3. Calidad del suelo. Análisis químico. La Habana: Oficina Nacional de Normalización.
- Ojeda-Quintana LJ; Arteaga-Rodríguez O; Escobar-Escobar LA; Lopez-Milian A. 2020 Efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y humus de lombriz en el establecimiento de *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone cv. Cuba CT-115. Idesia 38(2):5–11. doi: [10.4067/S0718-34292020000200005](https://doi.org/10.4067/S0718-34292020000200005)
- Oliveira TB; Mello AH de; Ferreira LA. 2014. Influência da inoculação de fungos micorrízicos em amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) em pastagens no projeto de assentamento Belo Horizonte I em São Domingos do Araguaia-PA. Enciclopédia Biosfera 10(18):1988–1999. bit.ly/3wHzCo8
- Peniche-González IN; González-López ZU; Aguilar-Pérez CF, Ku-Vera JC; Ayala-Burgos AJ; Solorio-Sánchez FJ. 2014. Milk production and reproduction of dual-purpose cows with a restricted concentrate allowance and access to an association of *Leucaena leucocephala* and *Cynodon nlemfuensis*. Journal of Applied Animal Research. 42(3):345–351. doi: [10.1080/09712119.2013.875902](https://doi.org/10.1080/09712119.2013.875902)
- Phillips JM; Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. Transactions of the British Mycological Society 55(1):158–161. doi: [10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Quiñones-Aguilar EE; Hernández LV; López L; Rincón G. 2019. Efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de rizósfera de Agave como promotores de crecimiento de papaya. Terra Latinoamericana 37(2):163–174. doi: [10.28940/terra.v37i2.397](https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.397)
- Rabie GH; Aboul-Nasr MB; Al-Humiany A. 2005. Increased salinity tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* and a nitrogen-fixer *Azospirillum brasilense*. Mycobiology 33(1): 51–60. bit.ly/3V4x9ND
- Ramírez-Avilés L; Solorio-Sánchez FJ; Aguilar-Pérez CF; Ayala-Burgos AJ; Ku-Vera JC. 2019. *Leucaena leucocephala* feeding systems for cattle production in Mexico. Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales 7(4):375–380. doi: [10.17138/TGFT\(7\)375-380](https://doi.org/10.17138/TGFT(7)375-380)
- Rodríguez-Eugenio N; McLaughlin M; Pennock D. 2019. La contaminación del suelo: una realidad oculta. Roma, FAO. 144 p. [handle/20.500.14283/19183es](https://hdl.handle.net/20.500.14283/19183es)

- Sánchez E; Ruiz JM; Romero L; Preciado-Rangel P; Flores-Córdova MA; Márquez-Quiroz C. 2018. ¿Son los pigmentos fotosintéticos buenos indicadores de la relación del nitrógeno, fósforo y potasio en frijol ejotero? *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 5(15):387–398. doi: [10.19136/era.a5n15.1757](https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1757)
- Santos PM dos; Santos AC dos; Negreiros Neto JV de; Araújo A; Silva JE da. 2011. Caracterização de pastagens de capim tanzânia e mombaça consorciados com estilosantes em ecótono de transição Cerrado: Floresta Amazônica. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 6(1):163–173. doi: [10.5039/agraria.v6i1a817](https://doi.org/10.5039/agraria.v6i1a817)
- Silva MMPD; Vásquez HM; Bressan-Smith RE; Silva JFCD; Erbesdobler EDA. 2001. Diferenças varietais nas características fotossintéticas de *Pennisetum purpureum* Schum. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30(6 suppl):1975–1983. doi: [10.1590/S1516-35982001000800003](https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000800003)
- Tajini F; Drevon JJ. 2012. Effect of arbuscular mycorrhizas on P use efficiency for growth and N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientific Research and Essays* 7(16):1681–1689. doi: [10.5897/SRE12.093](https://doi.org/10.5897/SRE12.093)
- Tajini F; Trabelsi M; Drevon JJ. 2012. Arbuscular mycorrhizas by contact with mycorrhized *Stylosanthes guianensis* enhance P use efficiency for N₂ fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *African Journal of Microbiology Research* 6(6):1297–1305. doi: [10.5897/AJMR11.1577](https://doi.org/10.5897/AJMR11.1577)
- Tamayo-Aguilar Y; Martín-Alonso GM; Castañeda E; Sánchez CA; Ramos-Hernández L; Santiago-Martínez GM; Rodríguez-Matos Y. 2021. Selección de cepas eficientes de *Rhizobium* y micorrizas en *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 8(1):13–24. bit.ly/3WL2w0Y
- Tao Zhang; Yu Sun; Shi Zhaoyong; Gu Feng. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi can accelerate the restoration of degraded spring grassland in Central Asia. *Rangeland Ecology & Management* 65(4):426–432. doi: [10.2111/REM-D-11-00016.1](https://doi.org/10.2111/REM-D-11-00016.1)
- Toro M; Bazó I; López M. 2008. Micorrizas arbusculares y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Biofertilizantes nativos de sistemas agrícolas bajo manejo conservacionista. *Agronomía Tropical* 58(3):215–221. bit.ly/4aoRqSH
- Trouvelot A; Kough JL; Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de micorrization VA d'un systeme radicaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En: Gianinazzi-Pearson V. y Gianinazzi S, eds. 1986. *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. INRA, Paris. p. 217–221. ISBN: 978-2853407748
- Urbina-Cruz FM; Pinto R; Ramírez R; Guevara F; Raj D; Venegas JA. 2019. Composición botánica y calidad de la dieta de bovinos en un sistema silvopastoril intensivo. *Avances en Investigación Agropecuaria* 23(2):23–30. bit.ly/4bJCEa2
- Vincent JMA. 1970. Manual for the practical study of root nodule bacteria. En: *International Biological Programme Handbook*, No. 15. Blackwell Scientific. ISBN: 9780632064106
- Zúñiga-Estrada L; Tirado JL; Guillén-Enríquez RR; de la Cruz-Lazaro E; Nava-Santos JM; Preciado P. 2022. Efecto del N mineral y N₂ sobre la nutrición nitrogenada en la planta de soya. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 13(6):1055–1066. doi: [10.29312/remexca.v13i6.3311](https://doi.org/10.29312/remexca.v13i6.3311)

(Recibido para publicación 17 diciembre 2023; aceptado 24 abril 2024; publicado 31 de mayo 2024)

© 2024



Tropical Grasslands-Forrajés Tropicales una revista de acceso abierto publicada por el *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Este trabajo está bajo la licencia Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).