

## Artículo Científico

# Inoculación con rizobios y hongos micorrízicos arbusculares en plantas de *Leucaena leucocephala* en etapa de vivero y en sustrato con pH neutro

## *Inoculation with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in Leucaena leucocephala plants in nursery phase in a neutral pH substrate*

GUSTAVO CRESPO-FLORES<sup>1</sup>, HUGO M. RAMÍREZ-TOBIAS<sup>1</sup>, MOISÉS R. VALLEJO-PÉREZ<sup>2</sup>, HERIBERTO MÉNDEZ-CORTÉS<sup>1</sup> Y PEDRO J. GONZÁLEZ-CAÑIZARES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), Soledad de Graciano Sánchez, SLP, México. [agronomia.uaslp.mx](http://agronomia.uaslp.mx)

<sup>2</sup>Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología, UASLP, San Luis, SLP, México. [ciacyt.uaslp.mx](http://ciacyt.uaslp.mx)

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación simple y combinada de tres aislados locales de rizobio (R1, R2 y R3) y dos especies de hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus cubense* -HMA1- y *Claroideoglomus claroideum* -HMA2-) en la colonización micorrízica, la nodulación, el crecimiento y la producción de biomasa de *Leucaena leucocephala*, en sustrato con pH cercano a la neutralidad y bajo condiciones de invernadero. Se evaluaron 13 tratamientos en un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones. La inoculación y co-inoculación promovió mayor crecimiento vegetal con respecto al testigo sin inocular y al tratamiento solamente fertilizado. Dentro de los tratamientos de inoculación y co-inoculación, sobresalió un aislado de rizobio (R2) por producir la mayor altura de planta y producción de folíolos, en tanto, las combinaciones R3+HMA1 y R3+HMA2 promovieron la mayor altura de plantas, también promovieron mayor biomasa junto a R1+HMA1. Además, la combinación R3+HMA2 destacó por presentar elevado número de esporas de HMA, frecuencia e intensidad de colonización micorrízica y actividad de los nódulos. Se concluye que la inoculación con aislados locales de rizobio y su combinación con HMA favorece el desarrollo de estructuras micorrízicas, la nodulación, el crecimiento y la producción de biomasa de *L. leucocephala* crecida en sustrato con pH neutro. Se identificó al aislado R2 y la combinación R3+HMA2 como inoculantes efectivos para aumentar el crecimiento vegetal.

**Palabras clave:** Fijación biológica de nitrógeno, HMA, leguminosas forrajeras, rhizobium.

### Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of the simple and combined inoculation with three local rhizobia isolates (R1, R2 and R3) and two species of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus cubense* -AMF1- and *Claroideoglomus claroideum* -AMF2-) on mycorrhizal colonization, nodulation, growth and biomass production of *Leucaena leucocephala* in a substrate with a close to neutral pH under greenhouse conditions. Thirteen treatments were evaluated in a completely randomized design with five replications. The inoculation and co-inoculation promoted greater plant growth with respect to the control without inoculation and to the fertilization treatment. Within the inoculation and co-inoculation treatments, one rhizobium isolate (R2) stood out for producing the highest plant height and leaflet production, while the R3 + AMF1 and R3 + AMF2 combinations promoted the highest plant height, and also promoted higher biomass together with R1 +

Correspondencia: Hugo M. Ramírez Tobías, Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UASLP. Carretera San Luis Matehuala Km. 14.5, Ejido Palma de la Cruz, 78321 Soledad de Graciano Sánchez, SLP, México. Email: [hugo.ramirez@uaslp.mx](mailto:hugo.ramirez@uaslp.mx)

AMF1. In addition, the R3 + AMF2 combination stood out for presenting a high number of AMF spores, frequency and intensity by AMF colonization, and nodule activity. It is concluded that inoculation with local rhizobia isolates and their combination with AMF favors the development of mycorrhizal structures, nodulation, growth and biomass production of *L. leucocephala* grown in a substrate with neutral pH. Isolate R2 and the combination R3 + AMF2 were identified as effective inoculants to increase plant growth.

**Keywords:** AMF, biological nitrogen fixation, forage legumes, Rhizobium.

## Introducción

Las leguminosas forrajeras poseen características agronómicas y nutricionales que las posicionan como una excelente opción para la alimentación animal. La incorporación de esta familia de plantas en el sistema ganadero puede contribuir a mejorar la calidad de la dieta de los animales, si se maneja de manera integral (Ruíz et al. 2006). Las leguminosas, además, mejoran la estructura y la fertilidad del suelo mediante la fijación biológica del nitrógeno, a través de su simbiosis con bacterias conocidas como rizobios (Bianco y Cenzano 2018; Almaraz-Suárez y Ferrera-Cerrato 2007) las cuales se reproducen en estructuras especializadas denominadas nódulos (Hernández et al. 2015). La asimilación del nitrógeno atmosférico lograda con la simbiosis, promueve entonces la nutrición nitrogenada de las plantas.

*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit., es una leguminosa sobresaliente en zonas tropicales por sus altos contenidos de proteína en el follaje y frutos (Martínez et al. 2016); su rendimiento de biomasa elevado, y la rapidez de su establecimiento, en comparación con otras leguminosas arbustivas, sobre todo en condiciones favorables (Ruíz y Febles 1987). Por el valor de esta especie, algunos productores tratan de introducirla en otros ecosistemas donde, en ocasiones, las condiciones no son idóneas para su desarrollo. En este sentido, la inoculación con bioproductos a base de rizobios y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) puede ayudar al establecimiento de *L. leucocephala*, aún en condiciones menos favorables, debido a las bondades que estos microorganismos les confieren a las plantas.

Por otro lado, los HMA incrementan la adquisición de nutrientes y agua por las plantas mediante estructuras que se desarrollan en la rizosfera, producto de la colonización de las raíces por este hongo (Leigh et al. 2009). Está comprobado que la simbiosis tripartita rizobio-planta-HMA, conjuntamente con otros microorganismos de la rizosfera, contribuyen a mejorar su estado nutricional y rendimientos, además de conservar la fertilidad de los suelos (Toro et al. 2008).

Aunque se ha comprobado el beneficio experimentado por plántulas de *L. leucocephala* con la inoculación con HMA y rizobios (Rey et al. 2005), la efectividad de la simbiosis dependerá, en cierta medida, de la infectividad de las cepas (Tapia et al. 2010) y de las condiciones del suelo donde se pretende su establecimiento (Gryndler et al. 2009). Los estudios realizados sobre inoculaciones con HMA se han enfocado en ecosistemas caracterizados por climas cálidos y lluviosos, y en suelos con valores de pH ácidos o con valores tendientes a la acidez. Por ello, resulta necesario estudiar los efectos de la inoculación en suelos con otras características como aquellos con pH cercano a la neutralidad.

A través de algunos estudios, se ha podido comprobar que ciertas especies de HMA presentan afinidad por uno u otro tipo de suelo, más que entre hospedero y simbiote (González et al. 2016). Tal es el caso de la especie *Glomus cubense*, que suele ser más efectiva en suelos de mediana a alta fertilidad, en contraste con *Funneliformis mosseae* que se comporta con mayor efectividad en suelos de baja fertilidad, con tendencia a la acidez (Rivera y Fernández 2003).

En el caso de los rizobios se conoce de la especificidad existente entre la especie bacteriana y la planta hospedera, aunque algunas especies de plantas se consideran promiscuas por mostrar alta compatibilidad con una gran variedad de especies de estas bacterias. Pero también, el suelo puede ser determinante para el buen funcionamiento de esta simbiosis debido a que existen ciertos factores que la inhiben, como la salinidad, el pH, la deficiencia o toxicidad de ciertos elementos químicos (P, Ca, Mo y Al), la presencia de nitrógeno combinado ( $\text{NO}_3^-$ ) y el exceso o déficit de agua, etc. (De Souza et al. 2003).

En este sentido, es importante continuar las investigaciones relacionadas con el comportamiento de la efectividad de cepas y especies de HMA y rizobios, de manera aislada y conjunta, en distintas condiciones edáficas y especies de plantas. En el caso de este estudio se evaluaron inoculantes a base de estos microorganismos que funcionen eficientemente en condiciones con características que han sido poco estudiadas, como son el pH neutro y el clima semiárido.

La información generada de dichos estudios contribuirá a garantizar que el manejo de estos microorganismos sea efectivo en función de la productividad de las plantas en distintas condiciones.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó este trabajo para evaluar el efecto de la inoculación simple y combinada de cepas de HMA y aislados locales de rizobio, en el comportamiento de variables micorrízicas, y su efecto sobre la nodulación y el crecimiento de *L. leucocephala*.

## Materiales y Métodos

*Condiciones del experimento.* El experimento se realizó bajo invernadero en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), San Luis Potosí, México. El sustrato utilizado fue una mezcla de suelo y arena de río en una proporción 1:1. El suelo utilizado provenía de un área experimental de la UASLP, y la arena fue extraída del cauce de un río. Se agregó 1 kg de sustrato a cada bolsa para vivero cuyas dimensiones fueron 20.0 x 12.5 cm de altura y ancho respectivamente. El sustrato preparado presentó 35; 66.3; 3,300 y 540 mg/kg de P, K, Ca y Mg respectivamente y 34.5 mg/kg (0.7 % de las bases) de Na, 1.92 % de materia orgánica (MO), así como un pH= 6.9. Los métodos utilizados para determinar estos valores fueron los siguientes: pH (H<sub>2</sub>O) por potenciómetro (1:2.5, relación suelo:agua) ([NC ISO 10390 1999](#)), materia orgánica por el método de Walkley y Black ([NC 51 1999](#)), fósforo (P) asimilable por el método de extracción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 mol/L, Ca y Mg por complejometría y Na y K por fotometría de llama ([NC 52 1999](#)). Según los valores del análisis químico, el sustrato presentó concentraciones bajas de K y MO, altos valores de P asimilable, Ca y Mg, un porcentaje de Na aceptable y pH cercano a la neutralidad ([Agrolab 2005](#)). El sustrato presentó en promedio 140 esporas/50g, lo cual fue determinado mediante la extracción de las esporas en muestras de 50g de sustrato con la técnica de lavado y decantado húmedo ([Gerdemann y Nicholson 1963](#), modificado por [Herrera et al. 1995](#)); su cuantificación se realizó con un microscopio estereoscópico (BX43, OLYMPUS) sobre una placa de conteo con círculos concéntricos. La población de rizobacterias semejantes a rizobios presentes en el suelo se determinó mediante la metodología de recuento en placa por plaqueo ([Hoben y Somasegaran, 1982](#)), a partir de diluciones seriadas 1:10 de la solución del sustrato agregando 100 µl de cada dilución a la placa en el medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue Levadura

Manitol Agar (LMA) con Rojo Congo a un pH= 6.8 y a una temperatura de incubación de 28 °C, durante 4 días. Las colonias con características culturales semejantes a los rizobios, que no absorbieron el colorante Rojo Congo, se cuantificaron con un microscopio estereoscópico. El número de células bacterianas cuantificadas fue de 102 UFC/g de sustrato.

*Diseño experimental.* El experimento contó con 13 tratamientos, que consistieron en la inoculación de dos cepas de HMA (HMA1 y HMA2) y tres aislados de rizobios (R1, R2 y R3) inoculados de manera individual y en combinaciones, más un testigo sin inocular y un tratamiento de fertilización como referencia. Los tratamientos resultantes fueron: Testigo sin inocular; tratamientos de inoculación simple (HMA1, HMA2, R1, R2, R3); tratamientos de inoculación combinada o coinoculación (HMA1+R1, HMA1+R2, HMA1+R3, HMA2+R1, HMA2+R2, HMA2+R3); testigo sin inocular con fertilización (Fert). Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones.

*Inoculantes empleados.* El inóculo HMA1 [IMCAM 4 *Glomus cubense* (Y. Rodr. & Dalpé)] procede de la colección de hongos micorrízicos arbusculares del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) en San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. El inóculo HMA2 [*Claroideoglomus claroideum* (N.C. Schenck & G.S. Sm) C. Walker & A. Schüssler] fue aislado de una parcela en la zona agrícola de producción de cacahuete, en Ciudad Fernández, SLP, México (22°00'47.36"N 100°21'14.66"W), de un suelo arenoso con bajo contenido de arcilla. Ambos inóculos se prepararon a partir de esporas extraídas de inóculos previamente multiplicados en sustrato arcilloso esterilizado y *Sorghum vulgare* como planta hospedera. El cultivo de rizobios fue preparado en el medio LMA líquido a 28 °C y en condiciones de agitación, durante 24–30 horas ([Vincent 1970](#)), a partir de cepas que se aislaron de plantas de *Vachellia schaffneri* (R1 y R2) y *Leucaena leucocephala* (R3). Las muestras de raíces de estas plantas fueron recolectadas en su hábitat natural ubicados en sitios cercanos a la carretera Venustiano Carranza-Pajacuaran, Michoacán (20°07'09.8"N 102°36'52.5"W) y en la localidad Tocoy en el municipio San Antonio, San Luis Potosí (21°38'19.0"N 98°52'15.0"W), respectivamente.

*Propagación de las plantas.* Las semillas de *L. leucocephala* fueron sometidas a escarificación para facilitar su germinación, que consistió en sumergirlas en agua a 80 °C durante dos minutos, seguidamente fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante tres minutos, luego se pusieron a germinar en

bandejas de 200 cavidades con peat moss como sustrato. Cuando las plántulas alcanzaron entre 5–6 cm de altura, se trasplantaron a las bolsas que contenían la mezcla de suelo y arena y se inocularon. En el tratamiento de fertilización se aplicó a cada bolsa 0.125 g de fertilizante 17-17-17 soluble en agua (Vigoro Excelso) cada 15 días, a partir de los 21 días después del trasplante.

*Aplicación de los inoculantes.* Las especies de HMA se inocularon aplicando 0.5 ml de solución Ringer (NaCl 7.5 g, KCl 0.75 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g y NaHCO<sub>3</sub> 0.1 g en 1 L de H<sub>2</sub>O) que contenía 60 esporas de cada especie, directamente alrededor de las raíces de las plántulas. En el caso de los rizobios (R1, R2 y R3), 1 ml del inóculo se aplicó en el sustrato, en una región muy próxima a la corona radical. Cada ml de inóculo contenía 108 UFC. El número de UFC del inóculo se determinó mediante la técnica de goteo en placa ([Herigstad et al. 2001](#); [Hoben y Somasegaran 1982](#)).

*Evaluación de las variables de crecimiento.* El crecimiento de las plantas se evaluó a partir de la altura de planta (cm), el diámetro de tallo (mm) y el número de foliolos por cada planta. La altura se midió desde la superficie del sustrato hasta la yema terminal empleando una regla graduada de 40 cm de longitud y 1 mm de precisión. El diámetro del tallo se midió con un pie de rey digital a 1 cm de altura a partir de la superficie del sustrato. Las mediciones de altura y diámetro del tallo se realizaron a los 180 días después del trasplante (ddt), el número de foliolos a los 120 ddt. Al final del experimento, se procedió a separar la raíz de la parte aérea de cada planta. Seguidamente se colocaron las muestras en la estufa a 65 °C durante aproximadamente 72 horas hasta alcanzar valores de masa constante. El peso de masa seca (MS) se registró en una balanza Precisa LS320M SCS.

*Evaluación de la nodulación.* El número de nódulos totales y su actividad se evaluaron según lo indicado en FAO ([1985](#)). Para esto, las raíces fueron extraídas de la bolsa separándolas del sustrato y lavadas cuidadosamente con agua corriente. Una vez limpias, se realizó un conteo de los nódulos totales y su efectividad se determinó observando la coloración interna mediante un corte transversal del nódulo; aquellos que presentaron coloración roja a rosada se consideraron como nódulos activos por evidenciar presencia de leghemoglobina, mientras que los de color blanco se les consideró como nódulo no activo.

*Evaluación de las variables fúngicas.* La colonización micorrízica se determinó en raíces previamente lavadas con agua corriente y después fueron secadas al aire. Se

pesaron aproximadamente 200 mg de raicillas que fueron secadas a 70 °C, y se tiñeron según la metodología descrita por Phillips y Hayman en 1970. Se evaluó la frecuencia de colonización micorrízica, que expresa el grado de ocupación de las raicillas por los HMA, mediante el método de los interceptos ([Giovannetti y Mosse 1980](#)) y la densidad visual o intensidad de la colonización, según Trouvelot et al. ([1986](#)). La cuantificación del número de esporas (esporas/50g de sustrato) se realizó a partir de muestras de 50 g de sustrato de las macetas, extrayendo dichas estructuras mediante el tamizado y decantado por vía húmeda y su observación en microscopio ([Gerdemann y Nicholson 1963](#), modificado por [Herrera et al. 1995](#)).

*Análisis estadístico.* Los datos se evaluaron mediante el análisis de varianza de clasificación simple y se utilizaron cinco repeticiones. Para establecer las diferencias entre las medias se empleó la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan en los casos en que hubo efecto significativo de los tratamientos. Para el cumplimiento de los supuestos de normalidad, los datos correspondientes a las variables número de foliolos por planta, número de esporas/50g y porcentaje de nódulos efectivos se transformaron mediante el Sistema de Familias de Distribuciones de Johnson (3.11554 + 1.45266 \* Aseinh ((X - 76.2046) / 2.66838); (-0.595988 + 0.933598 \* Aseinh ((X - 479.853) / 57.6200); (1.14219 + 0.836499 \* Aseinh ((X - 95.1760) / 5.86159)). Para el caso del número de nódulos por planta se utilizó la función  $\sqrt{2(x)}$  y la función  $\arcsen \sqrt{x/100}$  para los porcentajes de colonización. Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 25 para Windows (SPSS 2017).

## Resultados

### *Efecto de la inoculación en las variables fúngicas y la nodulación*

Las estructuras micorrízicas mostraron diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ) entre los tratamientos. En todos los casos donde las plantas fueron inoculadas con las cepas de HMA, tanto solas como combinadas con rizobios, se produjeron más estructuras micorrízicas en comparación con el testigo sin inocular y el tratamiento fertilizado. A su vez, las combinaciones R2+HMA2 y R3+HMA2 superaron de manera significativa ( $p < 0.001$ ) al resto de los tratamientos con respecto a estas variables (Cuadro 1). Se observó una tendencia a mostrar mayores valores de frecuencia e intensidad de colonización para los tratamientos de inoculaciones combinadas, seguido por los HMA de manera aislada y por los rizobios sin combinar.

Con excepción del fertilizado, todos los tratamientos presentaron un comportamiento similar en cuanto al número de nódulos, incluyendo al testigo sin inocular. En el testigo sin inocular, aunque en menor grado, hubo nodulación producida por los rizobios residentes del suelo empleado en el sustrato, tal nivel de nodulación sólo superada estadísticamente ( $p < 0.001$ ) por el aislado R2. Sin embargo, el porcentaje de nódulos activos (%) se vio favorecido por la inoculación de los aislados de rizobios, especialmente cuando se combinaron con los HMA, con 93, 92 y 94% para R1+HMA1, R2+HMA2 y R3+HMA2, respectivamente (Cuadro 1).

#### Efecto de la inoculación sobre variables de crecimiento

La inoculación favoreció el crecimiento de *L. leucocephala*, los tratamientos R2, R1+HMA1, R3+HMA1, R2+HMA2 y R3+HMA2 fueron los que produjeron plantas más altas ( $P < 0.05$ ) que el testigo (Figura 1A). El aislado R2 sobresalió por promover mayor diámetro del tallo en las plantas, y diferente con respecto al testigo (Figura 1B). Las plantas inoculadas, con HMA o con rizobios, o inoculadas con ambos simbiontes independientemente, tendieron a presentar las mayores valores de altura,

número de folíolos y biomasa en la parte aérea.

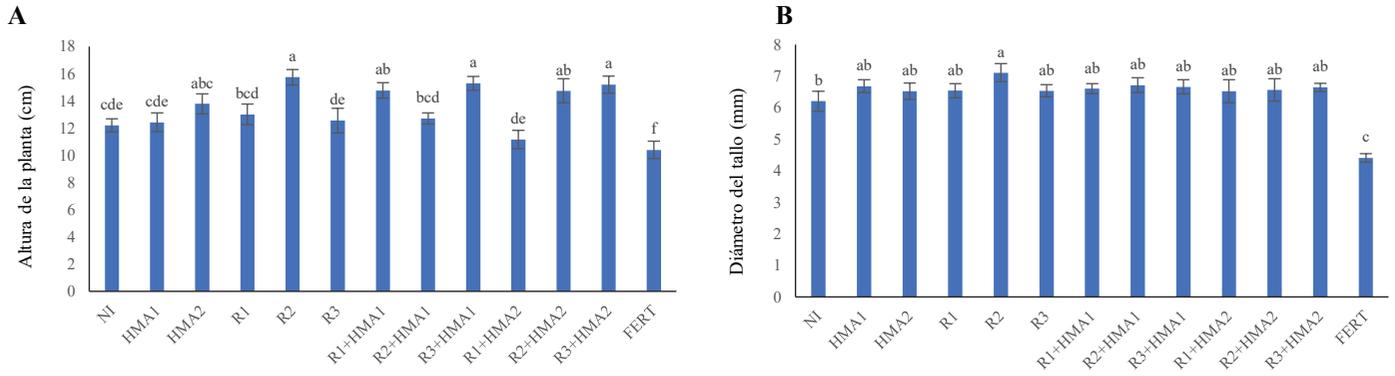
El número de folíolos por planta en los tratamientos inoculados fue mayor ( $P < 0.05$ ) que en el testigo sin inocular y que en el tratamiento fertilizado, con excepción de R1 y R1+HMA2. Las cepas de HMA inoculadas de manera simple y al combinarse con los aislados de rizobios, promovieron plantas con mayor número de folíolos que cuando se inoculó solamente con rizobios. La excepción a este comportamiento fue el aislado R2, el cual sobresalió por presentar la mayor cantidad de folíolos ( $P < 0.05$ ) por encima del resto de los tratamientos. En contraste, la combinación R1+HMA2 presentó valores inferiores al resto de los tratamientos inoculados (Figura 2).

La producción de biomasa aérea de las plantas también fue afectada por la inoculación de ambos microorganismos de manera significativa. Las plantas inoculadas con R1+HMA1, R2+HMA2 y R3+HMA2 produjeron más ( $P < 0.05$ ) MS biomasa aérea que el testigo sin inocular y el fertilizado. La MS de la raíz se comportó de manera similar en todos los tratamientos incluyendo al testigo sin inocular, y todos superaron al tratamiento fertilizado, tanto en la parte aérea como en las raíces de las plantas (Figura 3).

**Cuadro 1.** Efecto de la inoculación con rizobios y con HMA, en las variables fúngicas y de la nodulación en *L. leucocephala*.

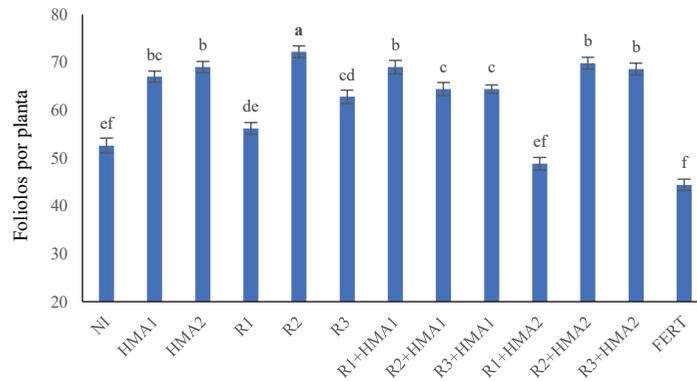
Tratamientos	Estructuras micorrízicas			Nodulación	
	Colonización (%)	Densidad visual (%)	Esporas/50 g	Nódulos/planta	Nódulos efectivos (%)
Testigo	(26) 0.53 <sup>f</sup>	(0.77) 0.09 <sup>de</sup>	(430) -1.26 <sup>i</sup>	(16) 3.79 <sup>b</sup>	(52) -1.08 <sup>e</sup>
HMA1	(37) 0.65 <sup>d</sup>	(1.46) 0.12 <sup>b</sup>	(587) 0.64 <sup>bc</sup>	(32) 5.24 <sup>ab</sup>	(72) -0.55 <sup>de</sup>
HMA2	(34) 0.62 <sup>de</sup>	(1.22) 0.11 <sup>bc</sup>	(517) -0.09 <sup>defg</sup>	(34) 5.81 <sup>ab</sup>	(69) -0.69 <sup>de</sup>
R1	(28) 0.56 <sup>f</sup>	(0.86) 0.09 <sup>d</sup>	(480) -0.60 <sup>gh</sup>	(28) 5.16 <sup>ab</sup>	(85) 0.15 <sup>c</sup>
R2	(32) 0.61 <sup>e</sup>	(1.02) 0.10 <sup>cd</sup>	(487) -0.50 <sup>fg</sup>	(53) 7.08 <sup>a</sup>	(88) 0.33 <sup>bc</sup>
R3	(31) 0.59 <sup>e</sup>	(0.98) 0.10 <sup>cd</sup>	(537) 0.21 <sup>bcde</sup>	(37) 5.75 <sup>ab</sup>	(90) 0.52 <sup>abc</sup>
R1+HMA1	(52) 0.80 <sup>b</sup>	(1.52) 0.12 <sup>b</sup>	(574) 0.49 <sup>bcd</sup>	(30) 5.35 <sup>ab</sup>	(93) 0.83 <sup>ab</sup>
R2+HMA1	(46) 0.74 <sup>c</sup>	(1.39) 0.12 <sup>b</sup>	(501) -0.28 <sup>efg</sup>	(41) 6.25 <sup>ab</sup>	(89) 0.41 <sup>bc</sup>
R3+HMA1	(47) 0.75 <sup>c</sup>	(1.19) 0.11 <sup>bc</sup>	(530) 0.04 <sup>cdefg</sup>	(25) 4.55 <sup>ab</sup>	(87) 0.35 <sup>bc</sup>
R1+HMA2	(46) 0.74 <sup>c</sup>	(1.46) 0.12 <sup>b</sup>	(540) 0.19 <sup>bcd</sup>	(36) 5.72 <sup>ab</sup>	(82) -0.12 <sup>cd</sup>
R2+HMA2	(54) 0.83 <sup>b</sup>	(2.44) 0.16 <sup>a</sup>	(602) 0.76 <sup>b</sup>	(36) 5.21 <sup>ab</sup>	(92) 0.97 <sup>ab</sup>
R3+HMA2	(58) 0.87 <sup>a</sup>	(2.45) 0.16 <sup>a</sup>	(841) 1.76 <sup>a</sup>	(43) 6.24 <sup>ab</sup>	(94) 1.08 <sup>a</sup>
Fert	(22) 0.48 <sup>g</sup>	(0.59) 0.08 <sup>e</sup>	(436) -1.19 <sup>hi</sup>	(0) 0 <sup>c</sup>	(0) -1.77 <sup>f</sup>
EE ±	0.004 <sup>***</sup>	0.001 <sup>***</sup>	0.060 <sup>***</sup>	0.237 <sup>***</sup>	0.11 <sup>***</sup>

<sup>abcde fghi</sup> Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para ( $P < 0.05$ ) (Duncan 1955). Números entre paréntesis (Medias de los datos originales). Números sin paréntesis (Medias de los datos transformados). EE representa el error estándar. \*\*\* $P < 0.001$ . R1, R2 y R3 (Aislados de rizobios). HMA1 (*G. cubense*) y HMA2 (*C. claroideum*). Fert (0.125 g de fertilizante 17-17-17 soluble en agua cada 15 días).



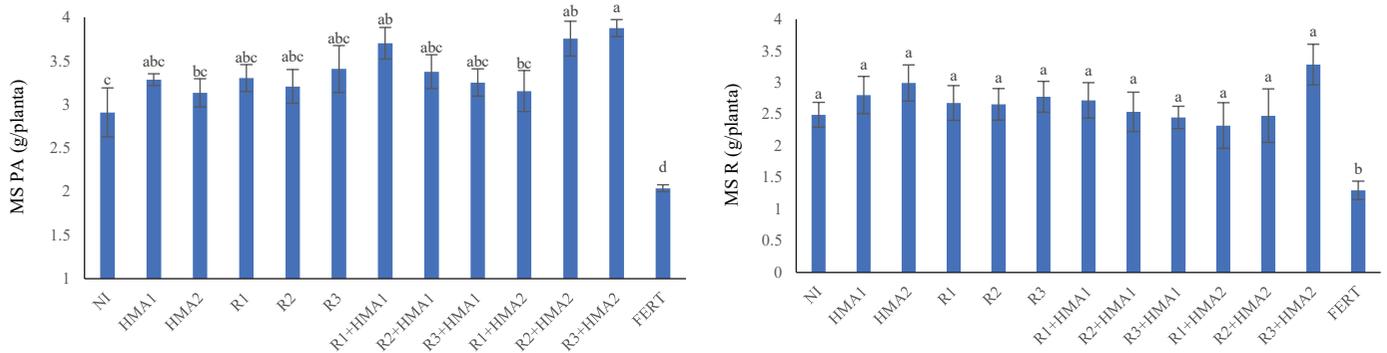
**Figura 1.** Efecto de la inoculación con rizobios y con HMA, en la altura de la planta (A) y diámetro de tallo (B) de *L. leucocephala* a los 180 después del trasplante.

abcdef Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para ( $P < 0.05$ ) (Duncan 1955). Las barras de error muestran el error estándar de las medias. R1, R2 y R3 (Aislados de rizobios). HMA1 (*G. cubense*) y HMA2 (*C. claroideum*). Fert (0.125 g de fertilizante 17-17-17 soluble en agua cada 15 días).



**Figura 2.** Efecto de tratamientos de inoculación y co-inoculación, con rizobios y con HMA, en el número de foliolos de plantas de *L. leucocephala* cuantificados a los 120 días después del trasplante.

abcdef Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para ( $P < 0.05$ ) (Duncan 1955). Las barras de error muestran el error estándar de las medias. R1, R2 y R3 (Aislados de rizobios). HMA1 (*G. cubense*) y HMA2 (*C. claroideum*). Fert (0.125 g de fertilizante 17-17-17 soluble en agua cada 15 días).



**Figura 3.** Efecto de tratamientos de inoculación y co-inoculación, con rizobios y con HMA, en la producción de masa seca de la parte aérea (MS PA) y raíz (MS R) de *L. leucocephala* a los 180 ddt.

abc Valores con letras no comunes en cada variable difieren significativamente para ( $P < 0.05$ ) (Duncan 1955). Las barras de error muestran el error estándar de las medias. MS PA (masa seca de la parte aérea). MS R (masa seca de la raíz). R1, R2 y R3 (Aislados de rizobios). HMA1 (*G. cubense*) y HMA2 (*C. claroideum*). Fert (0.125 g de fertilizante 17-17-17 soluble en agua cada 15 días).

## Discusión

En esta investigación se encontró que la inoculación y la coinoculación, tanto de rizobios como de HMA, solos o de manera combinada, favorece la generación de estructuras micorrízicas, la mayor colonización y también el mayor número de nódulos efectivos en *L. leucocephala* (Cuadro 1) en sustratos con pH cercano a la neutralidad. Resultados similares han sido documentados por Aguirre et al. (2015) al encontrar en *L. leucocephala* mayor crecimiento vegetal con la inoculación conjunta de rizobios y HMA, y las ventajas de la coinoculación también han sido señaladas para otras especies como *Pueraria phaseoloides* (González et al. 2012) y *Stylosanthes guianensis* (Crespo-Flores et al. 2014), pero en todos los casos trabajando en suelos ácidos o ligeramente ácidos. Este es el primer estudio que demuestra ese efecto benéfico en sustratos con pH cercano a la neutralidad. La interacción entre los microorganismos y la leguminosa permite el establecimiento de una simbiosis tripartita (rizobio-leguminosa-HMA), como han señalado anteriormente varios autores (Rabie et al. 2005; Lara et al. 2019). La simbiosis tripartita favorece el desarrollo de cada organismo de manera individual y en conjunto, lo que representa oportunidades de mejor crecimiento de las plantas asociadas, y, en consecuencia, mayor productividad (Toro et al. 2008).

El beneficio de la interacción tripartita registrada entre la leguminosa, los rizobios y los HMA en esta investigación se explica porque cada uno de los simbioses proporciona recursos que favorecen el funcionamiento de los otros. El proceso de fijación biológica del nitrógeno que realizan los rizobios requiere de gran cantidad de energía en forma de ATP (Adenosin trifosfato) para romper la molécula de  $N_2$  (Fernández-Pascual et al. 2002). Los HMA facilitan la absorción de P mediante el aumento de la superficie de exploración más allá del alcance de las raíces (Rivera y Fernández 2003; Rabie et al. 2005). Así, es probable que una mayor absorción de P favorecida por los HMA promueva el aprovisionamiento de ATP requerido por los rizobios. A su vez, la planta provee de recursos provenientes de la fotosíntesis a los simbioses, quienes los aprovechan para su crecimiento. Adicionalmente los HMA contribuyen a facilitar la absorción de otros nutrientes que favorecen el crecimiento vegetal (Smith 2002). Por su parte, los rizobios se destacan por la aportación de nitrógeno a las plantas, como producto de la fijación biológica. La fijación del N ocurre en los nódulos, en donde el N atmosférico es transformado a amonio, forma química asimilable para las plantas. Una mayor absorción de

nitrógeno favorece el crecimiento de las plantas, pues el N es el macronutriente requerido en mayor cantidad para el crecimiento vegetal (Wang et al. 2001).

El aumento en el crecimiento debido a la inoculación que se registró en esta investigación coincide con los encontrados por Quintana et al. (2014) y Rey et al. (2005), quienes al emplear la inoculación de estos microorganismos de manera aislada y combinada obtuvieron mayores valores en las variables de crecimiento y biomasa del cultivo con relación al testigo sin inocular, y las inoculaciones combinadas fueron más efectivas que las inoculaciones simples. Sin embargo, en el presente estudio, hubo también aislados que arrojaron valores superiores en dichas variables cuando se inocularon de manera individual, como el caso de R2 en el número de foliolos, la altura y el diámetro del tallo, lo que estuvo relacionado con la tendencia de este aislado a producir mayor número de nódulos (Cuadro 1). En este sentido, aunque por lo general, cuando se inoculan de manera combinada los rizobios y los HMA se refleja un mayor crecimiento en las plantas (Seguel 2014) que cuando se inoculan de manera aislada, la respuesta del hospedero va a depender de una combinación particular de cepas de ambos microorganismos (Castillo et al. 2008). Por otro lado, la efectividad de una cepa o aislado de rizobio va a depender mayormente de su especificidad con la especie vegetal (Wang et al. 2001). Lo anterior sugiere que R2 presenta mayor compatibilidad con *L. leucocephala*, así como con los HMA provenientes del sustrato, respecto al resto de los aislados de rizobio inoculados. De igual manera, se puede apreciar en los resultados la sinergia mostrada en el aislado R3 y la cepa HMA2 (R3+HMA2), al destacarse por producir mayor altura y MS en las plantas, mayor colonización y efectividad de los nódulos. Cabe destacar que, independientemente del efecto observado en las plantas de *L. leucocephala* debido a la inoculación, hay que tener en cuenta la interacción del hospedero y simbioses inoculados con los microorganismos presentes en el sustrato, el cual no fue esterilizado.

Aunque en todos los tratamientos coinoculados se manifestó la sinergia entre ambos simbioses por sus resultados frente al testigo sin inocular, las combinaciones R1+HMA1, R3+HMA1, R2+HMA2 y R3+HMA2 mostraron mayor efectividad en cuanto a la altura de las plantas (Figura 1) y R1+HMA1, R2+HMA2 y R3+HMA2 en la producción de MS de la parte aérea (Figura 3). El mayor crecimiento registrado en *L. leucocephala* coincidió con un incremento en la colonización micorrízica y en el número de nódulos efectivos (Cuadro 1).

La compatibilidad entre HMA y rizobios encontrada en este estudio, se ha venido estudiando y demostrando desde hace algunos años por varios autores. Se plantea que la colonización de las raíces por los HMA puede afectar a las comunidades de bacterias asociadas a la rizosfera, de manera directa en lo que refiere al suministro de energía mediante compuestos ricos en carbono, que son transportados desde la planta hospedera hacia la micorrizosfera mediante las hifas del hongo ([Bonfante y Anca 2009](#)). Indirectamente, se relacionan con los efectos de los HMA en el crecimiento de la planta hospedera, la exudación de sustancias estimuladoras del crecimiento y la mejora de la estructura del suelo, factores que incrementan la actividad de las bacterias nitrificadoras ([Antoun y Prévost 2005](#)).

La sinergia entre los HMA y los rizobios en favor de la productividad de las plantas ha sido también detectada por González et al. ([2012](#)) al evaluar el efecto de la coinoculación de aislados de rizobios y una cepa de HMA (*Glomus cubense*) en plantas de Kudzú (*Pueraria phaseoloides*), obteniendo incrementos en rendimiento y contenido nutricional de la leguminosa en aquellos tratamientos donde se combinaron ambos microorganismos. De manera similar, Martín et al. ([2015](#)), obtuvo mayores valores de masa seca en el cultivo de canavalia (*Canavalia ensiformis* (L.) D.C.) al inocular con aislamientos específicos de HMA por tipo de suelo.

El aislado R2 y la combinación R3+HMA2 destacaron en la mayoría de las variables estudiadas. R2 produjo mayor número de nódulos, altura de la planta, diámetro de tallo y número de foliolos. Con R3+HMA2 se consiguieron mayores valores de colonización, densidad visual, número de esporas, nódulos efectivos, altura de la planta y MS de la parte aérea (Figuras 1, 2 y 3; Cuadro 1). No obstante, también se observó que algunos tratamientos de inoculación tuvieron similitudes con el testigo sin inocular en la mayoría de las variables estudiadas. Esta situación puede estar determinada por la mayor o menor efectividad de las cepas de rizobios utilizados, o bien por la efectividad de las cepas residentes. Tal efectividad de cepas está mayormente marcada, en el caso de los HMA, por la especificidad cepa-suelo ([Rivera y Fernández 2003](#)), y en una especificidad cepa-especie de leguminosa en la mayoría de los casos de las especies de rizobios ([Balatti 1996](#)). En este sentido, se reconoce que el tipo de suelo determina la composición de las comunidades de HMA ([Miranda et al. 2008](#); [Oehl et al. 2010](#)), de manera que las características de las poblaciones de HMA residentes pueden influir también en la capacidad de las especies de

HMA introducidas para competir con tales poblaciones.

Uno de los factores que provoca la inhibición de la nodulación es el exceso de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en el suelo, debido a que se afecta la actividad de la enzima nitrogenasa. Según Paredes ([2013](#)), esta inhibición se debe a que el nitrato se une a algún receptor específico del *Rhizobium* sobre la raíz de la leguminosa, aunque esto no está totalmente demostrado. La cantidad de fertilizante empleado en el tratamiento correspondiente, al parecer en una dosis suficientemente alta para provocar la inhibición total de la nodulación natural de *L. leucocephala* (Cuadro 1), aparentemente influyó en que se produjera menor crecimiento y producción de MS en el tratamiento de fertilización comparado en el resto, incluyendo al testigo absoluto (Figura 1, 2 y 3).

El tratamiento testigo (sin inocular ni fertilizar) presentó nódulos en las raíces (Cuadro 1). Evidentemente, tales nódulos fueron producidos por los rizobios nativos o residentes del suelo utilizado como parte del sustrato. Como toda leguminosa, la nodulación de *L. leucocephala* ocurre de manera natural en varios tipos de suelos. En este sentido, varios autores ([Hernández et al. 2012](#); [Neira 2018](#); [Bueno y Camargo 2015](#)) han reportado aislamientos de rizobios en leucaena, ya sea directamente de sus raíces o de la rizosfera.

Teniendo en cuenta los resultados en el crecimiento de las plantas mostrados en este estudio, es probable que la inoculación de *L. leucocephala* con HMA y rizobios, especialmente en los tratamientos que demostraron mayor efectividad, haya favorecido su nutrición, de manera que, a pesar del bajo contenido de MO del sustrato, la movilización de nutrientes mediante las estructuras de la micorriza y el aporte de nitrógeno y otros elementos por el rizobio posiblemente contribuyó a compensar dicho déficit. *L. leucocephala* es una especie que crece favorablemente en suelos arenosos, de pH neutro y buena fertilidad, aunque también se ha probado que presenta cierta plasticidad ecológica, ya que algunos cultivares se adaptan a suelos incluso ácidos ([Pérez et al. 2008](#)). Y es en sustratos ácidos en los que se ha probado el efecto benéfico de la inoculación y co-inoculación; por lo que la presente investigación es la primera que documenta el efecto benéfico de la asociación tripartita en suelos con pH neutro. Lo anterior evidencia la efectividad de los aislados probados en este estudio, y aumenta las posibilidades de éxito en el uso de inoculantes a base de rizobios y HMA en un mayor rango de suelos según su pH.

R1 y R2 fueron aislados de *Vachellia schaffneri* y R3 fue aislado de *L. leucocephala*. Las características fisis-morfológicas y culturales y los resultados positivos

a una prueba de nodulación *in-vitro* permiten agrupar a los tres aislados en un mismo grupo, candidato a formar parte de los géneros *Rhizobium* o *Sinorhizobium* (datos no publicados). Resulta interesante que dichos aislados presentaran compatibilidad con *L. leucocephala*, incluso, R2 demostró ser tan eficiente en algunas variables, como R3 combinada con HMA2. Aunque *L. leucocephala* no es de las especies más promiscuas, como lo son especies de los géneros *Macropitium* y *Vigna*, se ha documentado que es capaz de nodular con otros rizobios, especialmente del género *Rhizobium* aislados de diferentes especies. No obstante, aunque nodulen no siempre resultan ser efectivos (Almaraz-Suárez y Ferrera-Cerrato 2007). Los resultados de este estudio aportan nuevos aislados de rizobio compatibles con *L. leucocephala* y que son promotores de crecimiento.

## Conclusiones

La combinación de aislados de rizobios y especies de HMA en sustratos con pH cercano a la neutralidad favorece el desarrollo de las estructuras micorrízicas, la nodulación, el crecimiento y producción de biomasa de *L. leucocephala*. El aislado R2 (procedente de la rizosfera de *Vachellia schaffneri*) y la combinación R3 (un aislado de la rizosfera de *L. leucocephala*) co-inoculado con HMA2 (*Claroideoglossum claroideum*) constituyen inoculantes efectivos para aumentar el crecimiento de *L. leucocephala*.

## Agradecimientos

Al apoyo recibido mediante 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), y a la Beca del CONACYT (638999) para estudios doctorales del primer autor. A los comentarios de dos revisores anónimos que contribuyeron a mejorar el manuscrito.

## Referencias

(Nota de los editores: Enlaces verificados el 27 de abril de 2022).

Agrolab. 2005. Guía de referencia para la interpretación análisis de suelos Agrolab. Pachuca Hidalgo, México. [bit.ly/3kivvFh](http://bit.ly/3kivvFh)

Aguirre JF; Valdés M; Velasco ME. 2015. Inoculación de

*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit, con rizobacterias y endomicorriza para aumentar su productividad en suelos ácidos. Agro Productividad 8:38–46. [bit.ly/3rWyurb](http://bit.ly/3rWyurb)

Almaraz-Suárez JJ; Ferrera-Cerrato R. 2007. Fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas. En: Ferrera-Cerrato R y Alarcón A, eds. Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta organismo. Trillas. México, D.F. p. 225–238. ISBN: 9789682478109.

Antoun H; Prévost D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui ZA, ed. 2005. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, The Netherlands. p. 1–38. doi: [10.1007/1-4020-4152-7\\_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_1)

Balatti PA. 1996. Interacciones tempranas Rhizobio-leguminosa. Revista de la Facultad de Agronomía 101:91–108. [sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/69406](http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/69406)

Bianco L; Cenzano AM. 2018. Leguminosas nativas: estrategias adaptativas y capacidad para la fijación biológica de nitrógeno. Implicancia ecológica. Idesia (Arica) 36:71–80. doi: [10.4067/S0718-34292018005002601](https://doi.org/10.4067/S0718-34292018005002601)

Bonfante P; Anca IA. 2009. Plants, mycorrhizal fungi and bacteria: a network of interactions. Annual Review of Microbiology. 63:363–383. doi: [10.1146/annurev.micro.091208.073504](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504)

Bueno L; Camargo JC. 2015. Nitrógeno edáfico y nodulación de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit en sistemas silvopastoriles. Acta Agronómica 64:349–354. doi: [10.15446/acag.v64n4.45362](https://doi.org/10.15446/acag.v64n4.45362)

Castillo CG; Rubio R; Urzúa H; Borie F. 2008. Interacción *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* y hongos micorrízicos en un Andisol con diferentes niveles de saturación de aluminio. Idesia (Arica) 26:7–19. doi: [10.4067/S0718-34292008000300002](https://doi.org/10.4067/S0718-34292008000300002)

Crespo-Flores G; Ramírez JF; González PJ; Hernández I. 2014. Coinoculación de cepas de rizobios y del hongo micorrízico arbuscular en *Stylosanthes guianensis* vc. CIAT-184. Revista Cubana de Ciencia Agrícola 48:297–300. [redalyc.org/articulo.oa?id=193032133016](http://redalyc.org/articulo.oa?id=193032133016)

De Souza D; Colozzi-Filho A; Balota EL; Hungria M. 2003. Long-term effects of agricultural practices on microbial community. En: García-Torres L; Benites J; Martínez-Vilela A; Holgado-Cabrera A, eds. Conservation Agriculture. Springer, Dordrecht. p. 301–306. [10.1007/978-94-017-1143-2\\_36](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1143-2_36)

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

Fernández-Pascual M; De María N; De Felipe MR. 2002. Fijación biológica del nitrógeno: Factores limitantes. En: Valladares F, ed. 2002. Ciencia y medio ambiente. CSIC, España. p. 195–202. [hdl.handle.net/10261/128283](http://hdl.handle.net/10261/128283)

Gerdemann JW; Nicholson TH. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46(2):235–244. doi: [10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)

- Giovanetti M; Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist* 84:489–500. [jstor.org/stable/2432123](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x)
- González PJ; Pérez G; Medina N; Crespo G; Ramírez JF; Arzola J. 2012. Co-inoculation of rhizobium strains and one of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus cubense*) and its effect on kudzu (*Pueraria phaseoloides*). *Cuban Journal of Agricultural Science* 46:331–334. [bit.ly/3vmNK2o](https://doi.org/10.17138/TGFT(4)82-90)
- 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-Forrajeros Tropicales* 4:82–90. doi: [10.17138/TGFT\(4\)82-90](https://doi.org/10.17138/TGFT(4)82-90)
- Gryndler M; Hřelová H; Cajthaml T; Havránková M; Rezáčová V; Gryndlerová H; Larsen J. 2009. Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization. *Mycorrhiza* 19:255–266. doi: [10.1007/s00572-008-0217-y](https://doi.org/10.1007/s00572-008-0217-y)
- Herigstad B; Hamilton M; Heersink J. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 44:121–129. doi: [10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)
- Hernández JL; Cubillos-Hinojosa JG; Milian PE. 2012. Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical* 2:51–62.
- Hernández I; Nápoles MC y Morales B. 2015. Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* (L.) Merrill) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultivos Tropicales* 36:65–72. [ref.scielo.org/swb83m](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x)
- Herrera RA; Ferrer RL; Furrázola E; Orozco MO. 1995. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. En Monasterio M, ed. *Biodiversidad en Iberoamérica. Ecosistemas, Evolución y Procesos sociales*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Mérida, Venezuela.
- Hoben HJ; Somasegaran P. 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 44:1246–1247. doi: [10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982](https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982)
- 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* 10:1035–1046. doi: <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i5.936>
- Leigh J; Hodge A; Fitter AH. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist* 181:199–207. doi: [10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x)
- 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* 36:22–29. [ref.scielo.org/n72tm5](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x)
- Martínez M; Reyes A; Lara A; Miranda LA; Huerta M; Uribe M. 2016. Composición nutricional de leucaena asociada con pasto estrella en la Huasteca Potosina de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 16:3343–3355. [redalyc.org/articulo.oa?id=263146726015](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x)
- Miranda EM de; Saggin Júnior JO; da Silva EMR. 2008. Selection of arbuscular mycorrhizal fungi for the forage peanut intercropped with signal grass. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43:1185–1191. (En Portugués). doi: [10.1590/S0100-204X2008000900013](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000900013)
- NC 51. 1999. Determinación del por ciento de materia orgánica. Comité Técnico de Normalización. No. 3. Calidad del suelo. Análisis químico. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NC 52. 1999. Determinación de las formas móviles de fósforo y potasio. Comité Técnico de Normalización. No. 3. Calidad del suelo. Análisis químico. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- NC ISO 10390. 1999. Determinación de pH. Comité Técnico de Normalización. No. 3. Calidad del suelo. Análisis químico. Oficina Nacional de Normalización, La Habana, Cuba.
- Neira J. 2018. Aislamiento y evaluación de la eficiencia simbiótica de rizobios de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit y *Centrosema macrocarpum* Benth. bajo condiciones de invernadero. Tesis de Pregrado. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto. Perú. [repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/3597](https://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/3597)
- Oehl F; Laczko E; Bogenrieder A; Stahr K; Bösch R; van der Heijden M; Sieverding E. 2010. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42:724–738. doi: [10.1016/j.soilbio.2010.01.006](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.01.006)
- Paredes MC. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Tesis de Pregrado. Universidad Católica Argentina, Buenos Aires, Argentina. [repositorio.uca.edu.ar/handle/123456789/393](https://repositorio.uca.edu.ar/handle/123456789/393)
- Pérez A; Wencomo H; Navarro M; Iglesias JM; Soca M; Cepero L; Canchila ER. 2008. Consideraciones acerca de la *Leucaena leucocephala* cv. X: una nueva opción forrajera para un ecosistema ganadero con suelos ácidos e infértiles. *Pastos y Forrajes* 31:355–366. [ref.scielo.org/bghn3n](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x)
- Quintana LJ; Herrera RA; Furrázola EF; Hernández C. 2014. Efecto de inoculaciones conjuntas de *Rhizobium*-Micorrizas Arbusculares en *Leucaena leucocephala* cv: Perú. *Centro Agrícola* 41:17–21. [repositorio.geotech.cu/jspui/handle/1234/4136](https://repositorio.geotech.cu/jspui/handle/1234/4136)
- 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* 33:51–60. [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24049474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24049474)

- Rey AM; Chamorro DR; Ramírez M. 2005. Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad del forraje de *Leucoena leucocephala*. Revista Corpoica 6:52–59. doi: [10.21930/rcta.vol6\\_num2\\_art:49](https://doi.org/10.21930/rcta.vol6_num2_art:49)
- Rivera R; Fernández K. 2003. Bases científico técnicas para el manejo de los sistemas agrícolas micorrizados eficientemente. En: Rivera, R. y Fernández, K, eds. 2003. Manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio de caso: el Caribe. INCA. La Habana, Cuba. p. 51–94. [repositorio.geotech.cu/jspui/handle/1234/3461](https://repositorio.geotech.cu/jspui/handle/1234/3461)
- Ruíz T; Febles G. 1987. Leucaena. Una opción para la alimentación en el trópico y subtropico. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
- Ruíz TE; Castillo E; Alonso J; Febles G. 2006. Factores del manejo para estabilizar la producción de biomasa con leguminosas en el trópico. Avances en Investigación Agropecuaria 10:3–20. [redalyc.org/articulo.oa?id=83710101](https://redalyc.org/articulo.oa?id=83710101)
- Seguel A. 2014. El potencial de las micorrizas arbusculares en la agricultura desarrollada en zonas áridas y semiáridas. Idesia (Arica) 32:3–8. doi: [10.4067/S0718-34292014000100001](https://doi.org/10.4067/S0718-34292014000100001)
- Smith SE. 2002. Soil microbes and plants: raising interest, mutual gains. The New Phytologist 156:142–144. [jstor.org/stable/1514008](https://www.jstor.org/stable/1514008)
- Tapia J; Ferrera RJ; Varela L; Rodríguez JC; Soria JC; Tiscareño MA; Loredó C; Alcalá J; Villar C. 2010. Infectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salinos en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). Revista Mexicana de Micología 31:69–74. [ref.scielo.org/tj5n7b](https://ref.scielo.org/tj5n7b)
- 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 58:215–221. [bit.ly/3KnrpX0](https://bit.ly/3KnrpX0)
- Trouvelot A; Kough JL; Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de micorrization VA d'un systeme racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En: Gianinazzi-Pearson V; Gianinazzi S, eds. 1986. Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. p. 217–221. INRA, Paris, Francia.
- Vincent JMA. 1970. Manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme Handbook. No. 15. Blackwell scientific, Oxford, UK.
- Wang ET; Martínez J; López I. 2001. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Microbios. En: Martínez-Romero E; Martínez-Romero J, eds. 2001. Microbios. Universidad Nacional Autónoma de México, México. [bit.ly/3kpKTiQ](https://bit.ly/3kpKTiQ)

(Recibido para publicación 28 febrero 2021; aceptado 23 marzo 2022; publicado 31 May 2022)

© 2022



*Tropical Grasslands-Forrajés Tropicales* is an open-access journal published by *International Center for Tropical Agriculture (CIAT)*, in association with *The Tropical Crops Genetic Resources Institute of The Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (TCGRI-CATAS)*. This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license.