

## EFFECTO DE LA COINOCULACIÓN DE CEPAS DE RIZOBIOS Y UNA CEPA DE HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR EN *STYLOSANTHES GUIANENSIS* VC. CIAT-184

Gustavo Crespo Flores<sup>1</sup>, Juan F. Ramírez<sup>2</sup>, Pedro José González Cañizares<sup>1</sup>, Ionel Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Cuba. [gcflores@inca.edu.cu](mailto:gcflores@inca.edu.cu)

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones de Pastos Forrajes (IIPF). La Habana, Cuba.

Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque.

Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas 32700, La Habana, Cuba

Tel: (53) (47) 86 13 74-86 12 73

Se evaluó el efecto de la coinoculación de tres cepas de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular (HMA) en *Stylosanthes guianensis* vc. CIAT-184. El experimento se realizó en la Estación de Pastos y Forrajes de Cascajal, en la provincia Villa Clara, sobre un suelo Gley Nodular Ferruginoso, en el cual se estudiaron ocho tratamientos (las cepas de rizobios Sty-1, Sty-2 y Sty-3, solas y combinadas con la especie de HMA *Funneliformes mosseae*, un testigo con *F. mosseae* sin rizobio y otro sin rizobio ni *F. mosseae*), distribuidos en un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones. Las cepas Sty-2 y Sty-3 incrementaron significativamente la nodulación (31-40 nódulos/planta<sup>-1</sup>) y la concentración de nitrógeno en la biomasa aérea (3.55-4.00%), en relación con Sty-1 y los tratamientos testigo; de igual modo, *F. mosseae* incrementó los porcentajes de frecuencia e intensidad de colonización y densidad de esporas en la rizosfera, así como las concentraciones de P en la biomasa aérea (0.25%). La coinoculación de ambos microorganismos mejoró la efectividad de la nodulación e incrementó las estructuras micorrízicas y el rendimiento del estilósante, obteniéndose los mejores resultados con las cepas Sty-2 y Sty-3 en presencia de *F. mosseae*. Se comprobó, en las condiciones en que se condujo este experimento, el efecto sinérgico de las bacterias nitro fijadoras y los hongos micorrízicos arbusculares, así como las ventajas de la coinoculación de ambos microorganismos para mejorar el rendimiento y el valor nutritivo del estilósantes, al menos en su establecimiento.

**Palabras clave:** fijación biológica de nitrógeno, micorrizas arbusculares, leguminosas forrajeras, nutrición.

## Introducción

Para garantizar un mejor establecimiento y persistencia de las leguminosas forrajeras se precisa de un suministro adecuado de nutrientes, sobre todo cuando estas se cultivan en asociación con gramíneas (Urbano *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta que las asociaciones simbióticas que se establecen entre estas plantas, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y bacterias del género como *Rhizobium*, conjuntamente con otros microorganismos de la rizosfera contribuyen a mejorar el estado nutricional y los rendimientos de las leguminosas forrajeras, además de conservar la fertilidad de los suelos (Toro *et al.*, 2008), el manejo efectivo de los microorganismos rizosféricos puede constituir un modelo agrícola ecológico y económicamente viable para incrementar la productividad, persistencia y valor nutritivo de las leguminosas forrajeras y a la vez, reducir el uso de fertilizantes convencionales (González *et al.*, 2012).

Basado en estas premisas se realizó este estudio, para evaluar el efecto de la coinoculación de tres cepas de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular (HMA) eficiente, en el estado nutricional y el rendimiento de biomasa de *Stylosanthes guianensis* vc. CIAT 184 durante su establecimiento.

## Materiales y Métodos

El experimento se realizó en la Estación de Pastos y Forrajes de Cascajal, ubicada en Santo Domingo, provincia Villa Clara, Cuba, sobre un suelo Gley Nodular Ferruginoso (Anon, 1999), el cual se caracteriza por tener un pH en H<sub>2</sub>O fuertemente ácido; con un contenido de materia orgánica (MO) bajo, y el fósforo (P), al igual que los valores de calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), potasio (K) y la capacidad de cambio catiónico (CCB), se muestran en niveles muy bajos, según Paneque *et al.* (2010).

Se evaluaron ocho tratamientos conformados por las cepas de rizobios Sty-1, Sty-2 y Sty-3, solas y combinadas con la inoculación de la cepa de HMA INCAM-2, un ecotipo de la especie *Funneliformes mosseae* ((Nicol. & Gerd.) Schüssler & Walker, 2010), más un testigo con el HMA sin rizobio y otro sin inocular. Estos se distribuyeron en un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones.

Las parcelas tenían un área total de 21 m<sup>2</sup> y un área de cálculo de 14 m<sup>2</sup> (seis surcos de 5 m de largo).

La siembra se efectuó en junio de 2011. El estiloso se sembró en surcos separados a 70 cm y a chorrillo ligero, con una dosis de 8 kg de semilla total ha<sup>-1</sup> (2 kg de semilla pura germinable ha<sup>-1</sup>). La inoculación de las cepas de rizobios y la cepa de HMA se hizo mediante el método de recubrimiento de la semilla al momento de la siembra, los inoculantes contenían, en el caso del rizobio, 10 x 10<sup>10</sup> UFC g<sup>-1</sup>, y 33 esporas.g<sup>-1</sup> de la cepa de HMA. Las cepas de la rizobacteria provinieron de nódulos de plantas de *Stylosanthes guianensis* sin inocular, que crecieron espontáneamente en un pastizal de *Brachiaria brizantha* vc. Marandú, cultivado en condiciones similares a las del área donde se realizó este experimento. Pertenecen a la colección de cepas de rizobios del Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La cepa de HMA proviene de la colección del Laboratorio de Micorrizas, también del INCA. Se escogió por su alta eficiencia para incrementar los rendimientos de los pastos cultivados, en condiciones edafoclimáticas similares a la de este experimento (Ramírez *et al.* 2006).

Se efectuaron dos cortes, el primero se realizó a los 120 días después de la siembra y se determinó el rendimiento de biomasa de la leguminosa, y sus contenidos de N, P y K. El rendimiento de MS se estimó a partir del rendimiento de MV y el % de MS. Para el segundo corte (60 días posterior al primero), se procedió de la misma manera que en el primero, pero además, de cada parcela se tomaron 10 submuestras de raíces, para evaluar la frecuencia y la intensidad de la colonización. Se tomaron muestras de raíces para evaluar la nodulación de las plantas, y de suelo de la rizosfera para determinar la densidad de esporas de HMA.

Los resultados se evaluaron a través del análisis de varianza. En los casos donde se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la dócima de comparación múltiple de Duncan (1955) para establecer las diferencias significativas entre las medias.

### **Resultados y discusión**

Se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos para las estructuras micorrízicas del estilósante (tabla 1). La inoculación de *F. mosseae* incrementó la frecuencia e intensidad de la colonización y densidad de esporas, lo que corroboró la efectividad de esta cepa para alcanzar niveles de ocupación radical mayores que los HMA residentes (Ramírez *et al.*, 2006), al menos en las condiciones de este experimento; además, en estas variables, al combinarse esta cepa de HMA con las cepas de rizobios Sty-2 y Sty-3, pudo observarse diferencias significativas con respecto a las cepas inoculadas por separado.

Al respecto Miranda *et al.*, (2005), plantearon que la eficiencia de la inoculación de HMA para promover el crecimiento de las plantas, depende de su capacidad para competir con los HMA nativos. Esto se relaciona con la infectividad de la cepa, su capacidad para producir hifas externas, la velocidad de la hifa para colonizar las raíces y su habilidad para mantener niveles de colonización en condición competitiva.

Tabla 1. Efecto de los tratamientos en las estructuras fúngicas y la nodulación del estilosante.

Tratamientos		Estructuras micorrízicas			Nodulación	
Cepa rizobio	HMA	Colonización (%)	Densidad visual (%)	Esporas/ 50 g	Nódulos/planta	Nódulos efectivos (%)
No	No	29,50 c	1,35 c	189 c	14 c	38d
S1	No	31,28 c	1,35 c	220 c	19 c	41d
S2	No	32,50 c	1,32 c	217 c	32 ab	66c
S3	No	31,15 c	1,35 c	217 c	31 ab	89b
No	Sí	49,35 b	2,46 b	410 b	15 c	40d
S1	Sí	48,50 b	2,48 b	414 b	22 c	42d
S2	Sí	59,00 a	2,84 a	517 a	40 a	98a
S3	Sí	59,83 a	2,85 a	511 a	39 a	96a
ES		1,35*	0,03*	3,85*	2,51*	1,88*

Promedios con letras no comunes en cada variable difieren significativamente, según prueba de Duncan ( $P < 0.05$ ).

En la propia tabla se observa que las cepas de rizobios Sty-2 y Sty-3 proporcionaron una mayor nodulación al estilosante, aunque la mayor efectividad de sus nódulos se alcanzó cuando estas se combinaron con *F. mosseae*, exhibiendo ambas valores superiores al 95%. Las cepas de rizobios igualmente incrementaron las concentraciones de N en la biomasa aérea, pero los mayores tenores también se alcanzaron con las cepas Sty-2 y Sty-3 en presencia de *F. mosseae* (Tabla 2).

Los tratamientos inoculados con *F. mosseae* reflejaron las mayores concentraciones de fósforo en la biomasa aérea, esto parece tener relación con los valores obtenidos en las estructuras micorrízicas del estilosante, lo que confirma el papel de los HMA en la mejora de la nutrición fosfórica de las leguminosas forrajeras, observado también por de Miranda *et al.*, (2008) y Carneiro *et al.*, (2010), al inocular cepas de HMA en estos cultivos. Las cepas de rizobios y de HMA, por sí solas, incrementaron el rendimiento de MS, en relación con los correspondientes testigos sin inocular, pero los mayores rendimientos se obtuvieron cuando se combinaron Sty-2 y Sty-3 con *F. mosseae*. Estos resultados coinciden con los encontrados por Karti (2009), quien observó que las especies forrajeras *Pueraria phaseoloides* y *Centrosema pubescens* produjeron mayores rendimientos de biomasa con el uso combinado de fertilizantes biológicos a base de HMA y bacterias del género *Rhizobium*, que con cada uno de ellos de forma independiente.

Tabla 2. Efecto de los tratamientos en el contenido de nutrientes y el rendimiento de MS en la biomasa aérea *S. guianensis*.

Tratamientos		Contenido nutrientes (%)			MS (t ha <sup>-1</sup> )
Cepa rizobio	HMA	N	P	K	
No	No	2,62 d	0,19 b	1,28	3,76 d
S1	No	2,68 d	0,2 b	1,28	3,92 cd
S2	No	3,55 b	0,19 b	1,28	6,23 b
S3	No	3,61 b	0,2 b	1,28	6,2 b
No	Sí	3,16 c	0,25 a	1,29	4,63 c
S1	Sí	3,17 c	0,25 a	1,29	4,68 c
S2	Sí	4,00 a	0,24 a	1,29	8,76 a
S3	Sí	3,99 a	0,25 a	1,28	8,92 a
ES		0,08*	0,07*	0,01	0,26*

Promedios con letras no comunes en cada variable difieren significativamente, según prueba de Duncan ( $P < 0.05$ ).

Al integrar los resultados obtenidos en este experimento, se evidenció un efecto sinérgico importante entre las cepas de rizobios y la cepa de HMA *F. mosseae*, que se manifestó con una mejora de la efectividad de la nodulación y de la formación de estructuras fúngicas en las plantas, y también con un incremento de las concentraciones de N y P en la biomasa aérea y el rendimiento del estilósante.

Al parecer, los beneficios del efecto de la interacción de estos microorganismos, en el caso de las cepas de rizobios Sty-2 y Sty-3 y la cepa de HMA, desempeñaron una función fundamental en el crecimiento y establecimiento de la leguminosa cultivada mediante un mejor aprovechamiento de los nutrientes (Sarabia *et al.* 2010).

En este experimento se comprobó el efecto sinérgico de bacterias nitrificadoras y hongos micorrízicos arbusculares, así como las ventajas de la coinoculación de ambos microorganismos, para mejorar el rendimiento y estado nutricional de *Stylosanthes guianensis*, al menos durante su establecimiento.

#### Literatura citada

- Anon. 1999. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana, Cuba. 64 pp.
- Carneiro, R.F.V., Martins, M.A., Vásquez, H.M. e Detmann, E. 2010. Doses de fósforo e inoculação micorrízica no cultivo de estilósantes em solo sob condições naturais. Arch. Zootec. Vol. 59, Nº 227, p. 415-426.
- González, P. J., Pérez, G., Medina, N., Crespo, G., Ramírez, J.F. & Arzola, J. 2012. Co-inoculation of ryzobium strains and one of arbuscular mycorrhizial fungi (*Glomus cubense*) and its effect on kudzú (*Pueraria phaseoloides*) Technical note. Cuban J. Agric. Sci. 46:331

- Karti, P. D. M. 2009. Utilizing potential soil microorganisms, humic acid, grasses and legumes forages in marginal and degraded lands in Indonesia. 1st International Seminar on Anima/Industry. Faculty of Animal Science. Bogor Agricultural University, Indonesia. Pp. 211-215
- Miranda, J.C.C., Vilela, L. e Miranda, L.N. 2005. Dinâmica e contribuição da micorriza arbuscular em sistemas de produção com rotação de culturas. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 40: 1005-1014.
- Miranda de, E. M.; Sagguin Júnior, O. J.; Riveira da Silva, E. M. 2008. Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para o amendoim forrageiro consorciado com braquiária. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43 (9): 1185-1191.
- Paneque, V.M.; Calaña, J.M.; Calderón, M.; Borges, Y.; Hernández, T.; Caruncho. 2010. M. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Ediciones INCA, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, 160p.
- Ramírez, J. F.; González, P. J. & Salazar, X. 2006. Los hongos micorrizógenos arbusculares una opción para la producción eficiente de pastos en agroecosistemas frágiles. En: XV Congreso Científico del INCA. IV Simposio de Caracterización y Manejo de Microorganismos rizosféricos. Memorias. CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba. ISBN 959-7023-36-9.
- Sarabia, M., Madrigal, R, Martínez, M & Carreón, Y. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12:65
- Shüßler, A. & Walker, C. 2010. The *Glomeromycota*: a species list with new families and new genera. Gloucester: The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. 58 p.
- Toro, M., Bazó, I. & López, M. 2008. Micorrizas arbusculares y bacterias promotoras de crecimiento vegetal, Biofertilizantes nativos de sistemas agrícolas bajo manejo conservacionista. *Agronomía Trop.* 58:215
- Urbano, D; Castro, F. y Dávila, C. 2005. Efecto de la presión de pastoreo y fertilización NPK sobre la composición botánica de la asociación kikuyo-maní forrajero en la zona alta del estado Mérida. *Zootecnia Trop.* [online]. vol.23, n.4, p. 333-344. ISSN 0798-7269. 2005.