



**Efecto de la coinoculación de *Bradyrhizobium* sp. y Endomicorrizas
en el desarrollo inicial de *Pseudosamanea guachapele* (Kunth) Harms
en fase de vivero en Barbosa Antioquia**

AUTOR

NANCY ALEXANDRA URIBE GRACIANO

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD
Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente
Medellín, Colombia

2019

Efecto de la *coinoculación de Bradyrhizobium sp.* y *Endomicorrizas* en el desarrollo inicial de *Pseudosamanea guachapele (Kunth) Harms* en fase de vivero en Barbosa Antioquia

NANCY ALEXANDRA URIBE GRACIANO

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de zootecnista

Director (a):

Diego Rosendo Chamorro Viveros

MSc. Salud y Producción Animal.

Codirector (a):

Ana María Rey Obando

Dr. Ciencias Agrarias

Investigador Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD

Grupo de Investigación: Agroforestería y Biodiversidad Tropical

Línea de Investigación: Alimentación, Metabolismo y Nutrición Animal, Biodiversidad y Recursos Genéticos

Semillero de Agroforestería y BPA de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente

Medellín, Colombia

2019

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mis padres y mi hermana que siempre me han apoyado y acompañado incondicionalmente.

La mayor amenaza para nuestro planeta es la creencia que otra persona lo salvará.

Robert Swan

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, por permitirme adquirir el conocimiento con el que hoy cuento, a culminar mi carrera y poner en mi camino compañeros y profesores de los cuales he aprendido demasiado y han surgido buenos amigos.

Infinitas gracias al docente Diego Rosendo Chamorro Viveros, por acompañarme todos estos años y brindarme su valiosa amistad la cual me ha enseñado detalles muy valiosos que han enriquecido mi ser.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras	VII
Lista de tablas.....	VIII
Resumen	1
1. Introducción.....	3
2. Formulación del problema	7
3. Justificación.....	10
4. Objetivos	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos específicos.....	14
5. Marco teórico	15
5.1 Modelo de leguminosas y leñosas.....	15
5.2 Marco Conceptual	18
5.2.1 Modelo biofertilizantes	18
6. Metodología	27
6.1 Localización	27
6.2 Recolección de muestras	28
6.3 Materiales.....	28
6.4 Procedimiento de muestreo.....	28
6.5 Análisis de muestras	29
6.5.1 <i>Rhizobium</i>	29
6.5.2 Muestreo y preservación de nódulos	29
6.5.3 Materiales	29
6.5.4 Procedimiento.....	29
6.5.5 Aislamiento de cepas de <i>Rhizobium</i>	30
6.5.6 Materiales	30

6.5.7	Procedimiento.....	30
6.5.8	Identificación de <i>Rhizobium</i>	30
6.5.9	Tinción de Gram	30
6.5.10	Procedimiento.....	31
6.5.11	Selección de cepas inoculadas.....	31
6.5.12	Número y peso de nódulos de <i>Rhizobium</i>	32
6.6	Micorrizas.....	33
6.6.1	Micorrizas arbusculares	33
6.6.2	Aislamiento y conteo de esporas	33
6.6.3	Materiales.....	33
6.6.4	Procedimiento.....	33
6.6.5	Tinción de raíces y determinación del porcentaje de infección de los hongos MA en raíces de <i>Pseudosamanea guachapele</i>	34
6.6.6	Materiales.....	34
6.6.7	Procedimiento.....	34
6.7	Semillas.....	35
6.7.1	Proceso de desinfección.....	35
6.7.2	Proceso de escarificación	35
6.8	Sustrato.....	35
6.9	Pruebas de inoculación en vivero.....	35
6.10	Diseño experimental.....	35
6.10.1	Tratamientos:.....	36
6.11	Variables	38
6.12	Análisis de datos	39
6.12.1	Pruebas de comparación con medias de Tukey.....	39
7.	Resultados y discusión.....	40
7.1	Variables agronómicas.....	40
7.1.1	Crecimiento de las plantas	40
7.1.2	Longitud de raíz.	43
7.1.3	Diámetro Basal	44
7.1.4	Peso verde basal.	46
7.1.5	Peso seco basal.....	48
7.1.6	Materia seca basal.....	48
7.1.7	Peso verde radicular.	50
7.1.8	Peso seco radicular.....	51
7.1.9	Materia seca radicular.....	52
7.2	Variables microbiológicas.....	53
7.2.1	Formación de nódulos.....	54
7.2.2	Evaluación Micorrízica:	57
7.2.2.1	Numero de esporas.....	57
7.2.2.2	Colonización.	58
8.	Conclusiones y Recomendaciones.....	60
8.1	Conclusiones.....	60
8.2	Recomendaciones.....	61
	Bibliografía.....	62

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Individuo adulto en la vía Medellín - Santa Fe de Antioquia (1), Corteza (2). Ramas y flores (3), Fruto y flores (4).....	16
Figura 2. Partes de la micorriza.....	19
Figura 3. Esporas e hifas y raicillas micorrizadas asociadas con Iguá <i>Pseudosamanea Guachapele</i>	20
Figura 4. Dinámica del Fósforo.....	21
Figura 5. Formación de un Nódulo.	22
Figura 6. Morfología del Nódulo de Iguá <i>Pseudosamanea Guachapele</i>	23
Figura 7. Raíz con presencia de Nódulos asociados con Iguá <i>Pseudosamanea Guachapele</i> . ..	23
Figura 8. Mapa del Municipio de Barbosa (Antioquia).	27
Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de muestreo, preservación y aislamiento.....	32
Figura 10. Diagrama de flujo del proceso de aislamiento, conteo de esporas y colonización. ...	34
Figura 11. Diagrama de campo para el montaje del experimento.....	37
Figura 12. Diagrama de flujo del proceso de campo y recolección de información.	38
Figura 13. Evaluación de variable altura muestreo al cuarto mes.....	42
Figura 14. Evaluación variable longitud de raíz muestreo al cuarto mes.	43
Figura 15. Evaluación variable diámetro basal en las unidades experimentales.....	45
Figura 16. Evaluación de las variables peso verde y seco basal.	47
Figura 17. Procesamiento de raíces para posterior evaluación del peso verde radicular.....	50
Figura 18. Evaluación de la variable número de nódulos.	54
Figura 19. Evaluación variable conteo de esporas muestreo al cuarto mes.....	58

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Respuesta a la inoculación y fertilización química sobre la Altura (cm), Longitud Raíz (cm) y el Diámetro basal (mm)	40
Tabla 2. Respuesta a la inoculación y fertilización química sobre el crecimiento basal.....	46
Tabla 3. Respuesta a la inoculación y fertilización sobre el desarrollo radicular	50
Tabla 4. Respuesta a la inoculación y fertilización sobre variables microbiológicas.....	53

Resumen

La especie arbórea multipropósito *Pseudosamanea guachapele* conocida en Colombia como Iguá o cedro amarillo, establece simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno y con micorrizas vesículo arbusculares. Se realizó el aislamiento de cepas nativas de rizobios de árboles sanos procedentes del municipio de San Jerónimo Antioquia. Se seleccionó una cepa identificada como del género *Bradyrhizobium* sp. para ser evaluada individualmente y en mezclas con un inóculo mixto comercial de micorrizas (*Glomus fasciculatum*, *Scutellospora heterogama*, *Glomus mosseae*, *Glomus manihotis*, *Acaulospora rugosa* y *Entrophospora colombiana*). El efecto de la inoculación en *P. guachapele* se evaluó en fase de vivero durante cuatro meses bajo un diseño de bloques completamente al azar, siete tratamientos y tres repeticiones por tratamiento. Se realizaron mediciones mensuales de las variables agronómicas y microbiológicas. El efecto de la coinoculación de micorrizas y *Bradyrhizobium* en *P. guachapele* se vio evidenciada en el crecimiento basal con incrementos del 58,96%, en el peso seco basal con 207% y la materia seca basal del 39% respecto al tratamiento con fertilización química. En el desarrollo radicular se presentaron incrementos del 337% y 530% en el peso verde y seco radicular respectivamente, respecto al tratamiento con fertilización química. Microbiológicamente, se obtuvieron incrementos del 59% y 320% en el número y peso seco de los nódulos sobre el tratamiento sin fertilización. De igual manera, el porcentaje de colonización y número de nódulos presentaron incrementos del 61% y 59% respecto al tratamiento con fertilización química. El tratamiento que presentó las mejores respuestas fue el T1 conformado por 50 gramos de micorrizas e inoculación con *Bradyrhizobium*.

Palabras clave: *Pseudosamanea guachapele*, Endomicorrizas, *Bradyrhizobium*, Coinoculación

Abstract

The multipurpose arboreal species *Pseudosamanea guachapele* known in Colombia as Iguá or yellow cedar, stable symbiosis with nitrogen-fixing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae. Isolation of native strains of rhizobia from trees from the municipality of San Jerónimo Antioquia was carried out. A strain identified as of the genus *Bradyrhizobium* sp. was selected to be evaluated individually and in mixtures with commercial mixed inoculum of mycorrhizae (*Glomus fasciculatum*, *Scutellospora heterogama*, *Glomus mosseae*, *Glomus manihotis*, *Acaulospora rugosa* and *Entrophospora colombiana*). The response to coinoculation in *P. guachapele* was evaluated in the nursery for four months under a completely randomized block design, seven treatments and three repetitions per treatment. Monthly measurements of agronomic and microbiological variables were made. The effect of the inoculation of mycorrhiza and *Bradyrhizobium* *P. guachapele* was evidenced in the basal growth with increases of 58,96%, basal dry weight with 207% and basal dry matter of 39% with respect to the treatment with chemical fertilization. In radicular development there were increases of 337% and 530% in green weight and dry radicular, compared to treatment with chemical fertilization. Microbiologically, increases of 59% and 320% were obtained in the number and dry weight of the nodules on the treatment without fertilization and inoculation. The percentage of colonization and number of nodules showed increases of 61% and 59% with respect to the treatment with chemical fertilization. The treatment that presented the best answers was the T1 mycorrhiza 50 g and *Bradyrhizobium*.

Keywords: *Pseudosamanea guachapele* Endomycorrhizae, *Bradyrhizobium*, Coinoculation

1. Introducción

Los sistemas agropecuarios en Colombia contribuyen en el producto interno bruto en un 5.3% (DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadistas, 2014), se trata de un reglón que genera el 26% de la riqueza nacional, satisfaciendo parte de la demanda alimentaria de la nación y generando el 21% del empleo del país, es el sector que más involucra la ocupación de personas tanto a nivel rural como agroindustrial (7.5%) y del total de empleos generados por la agricultura en donde más del 50% son representados por el café y la ganadería (Guevara, 2002).

En este mismo sentido, para la economía de Colombia el sector ganadero es uno de los soportes más importantes, pues participa con cerca del 3.5% del producto interno bruto (PIB) Nacional, del 26% del PIB agropecuario y del 56% del PIB pecuario, además tiene una participación muy importante dentro de la economía rural colombiana porque genera unos 950.000 empleos directos, esto es la cuarta parte del total agropecuario y casi el 7% del total nacional (Lafaurie, 2008).

El Censo Nacional Agropecuario (DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadistas, 2016) permitió identificar el uso y la cobertura del suelo, entre los principales resultados obtenidos se destaca que del área total censada (111,5 millones de ha), el 56,7% corresponde a bosques naturales; el 38,6% tiene uso agropecuario; el 2,2%, uso no agropecuario y el 2,5% está designado para otros usos. En la distribución del área destinada al uso agropecuario, que equivale a 43,0 millones de ha, el 80,0% corresponde a pastos y rastrojos; el 19,7%, a tierras con uso agrícola; y el 0,3% está ocupado con infraestructura agropecuaria. En lo que concierne al área con uso agrícola (8,5 millones de ha), el 83,9% corresponde a cultivos (7,1 millones de ha); el 13,6% está asignado para áreas en descanso; y el 2,5%, para áreas en barbecho. El inventario bovino del territorio nacional para el año 2014 fue de 21.502.811 cabezas. De este total, el 35,8% del inventario bovino en el área rural dispersa censada se encuentra en los

departamentos de Antioquia, Córdoba, Casanare y Meta, es decir, 7.692.857 cabezas de ganado (DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadistas, 2016).

Actualmente, de acuerdo al Censo Pecuario Nacional (ICA, 2018), la Población Bovina en el país está distribuida en 599.953 predios y constituida aproximadamente por 26'367.814 animales, ubicados principalmente en los departamentos de Antioquia (11,52%), Córdoba (8,12%), Casanare (7,56%), Meta (7,39%), Caquetá (6,86%), Santander (6,05%), Cundinamarca (5,39%), Cesar (5,37%), Magdalena (5,16%) y Boyacá (4,45%) que agrupan el 67,87% de la población total nacional.

De acuerdo con estas estadísticas, en nuestro país la ganadería ocupa un lugar importante en el sector agropecuario reflejado en la extensión de tierra destinada a la siembra de pasturas y el aumento del censo bovino. Sin embargo, la producción ganadera se da en su mayoría de forma extensiva con bajo nivel tecnológico y poca inclusión de árboles (Vergara, 2010). Donde los impactos generados por la ganadería causados por la sobreutilización de áreas pastoriles en todo el país han acarreado la pérdida de fertilidad y la degradación del recurso suelo, además de la transformación de numerosas áreas de ecosistemas naturales principalmente bosques de trópico bajo, bosques andinos, páramos y humedales. Es así, que entre los años 1960 y 1995 los bosques naturales se redujeron de 94.6 a 72.4 millones de hectáreas, mientras que la ganadería se incrementó de 14.6 a 35.5 millones de hectáreas, cifra que ha venido aumentando en los últimos años a 40 millones de hectáreas (Murgueitio, Cuartas y Naranjo, 2008).

Pese a estos aumentos en área de pasturas, la producción de leche y carne evidencian un bajo crecimiento de productividad el cual ha decrecido en un 3% anual promedio, por las variaciones en el precio de los insumos y la disponibilidad de forraje verde para el alimento de los animales (DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadistas, 2014), expresado en baja carga animal (0,46 carga animal por hectárea) (Murgueitio, Cuartas y Naranjo, 2008) y bajos índices de producción por animal siendo el segundo país más costoso de América para la producción de leche (\$835 litro de leche) (Hernández, 2014).

Los bajos indicadores zootécnicos y la problemática ambiental han generado la necesidad de evaluar nuevos métodos que permitan incrementar los rendimientos agrícolas y forestales, junto con el desarrollo de una agricultura y silvicultura sostenible. En los últimos años se ha generado un activo desarrollo de sistemas agropecuarios ecológicos, sistemas holísticos de gestión de la producción que fomentan y mejoran la salud del agroecosistema y en particular la biodiversidad, los ciclos biogeoquímicos y la actividad biológica del suelo. Se basan en un reducido uso de

insumos externos y la no utilización de fertilizantes y plaguicidas de síntesis química, impulsado por la creciente sensibilidad del consumidor, que está exigiendo productos más sanos que no afecten su salud; en temas relacionados con la seguridad alimentaria, inocuidad, impactos ambientales y sociales, entre otros, dirigiendo su interés hacia productos que provengan de sistemas amigables con el medio ambiente (Murgueitio et al; 2009).

Los sistemas silvopastoriles son una alternativa socioeconómica y ambiental para la ganadería tropical mundial, dadas sus interacciones ecológicas e impactos económicos. En el trópico bajo colombiano, la incorporación de árboles en las praderas, principalmente especies fijadoras de nitrógeno, además de ofrecer un ambiente de bienestar para los animales, puede ser utilizada como barrera rompevientos, para control de erosión y mejorar la fertilidad de los suelos, originando beneficios productivos, ecológicos y económicos. Adicionalmente, ofrecen otros usos complementarios como son la producción de madera y frutos, la contribución a un microclima, la oferta de hábitat para la fauna silvestre, la regulación hídrica en cuencas hidrográficas y una mayor belleza del paisaje, proporcionándole otros ingresos al productor y ofreciendo mayor estabilidad económica a la empresa ganadera (Murgueitio, Cuartas y Naranjo, 2008; Chamorro y Rey, 2010; Chamorro, 2012).

Dentro de los sistemas silvopastoriles de trópico bajo es necesario identificar y evaluar nuevas especies multipropósito, es así como, la especie nativa forrajera *Pseudosamanea guachapele* (Kunth) Harms, leguminosa conocida por su capacidad de fijación biológica de nitrógeno, presenta altos contenidos nutricionales como alimento para rumiantes al contener niveles de proteína del 17 al 24%, niveles de fenoles inferiores al 6%, FDN y FDA de 63% y 37%, respectivamente (Cárdenas, Ángel Botero y Pérez, 2011). Además, las investigaciones en sistemas silvopastoriles realizados por el grupo de investigación Agroforestería y biodiversidad tropical, han demostrado los efectos positivos de esta especie en arreglos silvopastoriles (Chamorro, 2012). Por lo tanto, puede ser objeto de estudio como una especie forrajera promisoría para mejorar la productividad ganadera.

Acorde con la producción ganadera climáticamente inteligente, se viene reemplazado el uso la fertilización de síntesis química, por productos orgánicos e inoculantes microbianos disponibles en el mercado principalmente micorrizas y rizobios, la cual se plantea como una alternativa segura, efectiva y económica para recuperar la productividad de los suelos (Perea et al; 2009; Rey, Barahona, y Chamorro, 2014; Chamorro, 2012).

Los inoculantes microbianos han sido incorporados en prácticas de campo en todo el mundo con resultados satisfactorios, aunque, comparando con aplicaciones químicas en la agricultura, su presente impacto en los agromercados es pequeño. Sin embargo, la industria de agroquímicos cada día está más abierta al concepto de inoculantes biológicos, lo que ha generado un interés genuino en desarrollar productos microbianos confiables y que puedan actuar como complementos a los químicos que hay actualmente en el mercado y que están disponibles para el productor a un precio aceptable (Boraste et al; 2009; Rey, Barahona, y Chamorro, 2014).

Por lo anteriormente mencionado, esta investigación estuvo enfocada en la evaluación de la coinoculación de cepas nativas de *Rhizobium*, Endomicorrizas y fertilización química sobre el crecimiento y desarrollo de *Pseudosamanea guachapele* sobre variables dasométricas y microbiológicas en la fase inicial de crecimiento.

2. Formulación del problema

El sector agropecuario en Colombia a pesar de haber avanzado en tecnología, en cuanto al uso del suelo, registra todavía deficiencias que tienen que ver con: Pérdidas de suelo laborable, baja fertilidad y productividad de los sistemas de producción agropecuaria.

En regiones con suelos de escasa fertilidad, en terrenos de minifundistas y pequeños agricultores, el alto costo de los fertilizantes y las pérdidas de este elemento por lixiviación, hacen difícil un rendimiento sostenido de las pequeñas áreas de producción. A lo anterior, se suma la necesidad cada vez más sentida del agricultor de áreas marginales, por disminuir el tiempo o duración del barbecho o rastrojo, antes de establecer un nuevo cultivo.

Cada día es necesario proporcionar al campesino pequeño propietario una tecnología barata, mediante un aprovechamiento racional e integral de muchas especies vegetales que generalmente son subutilizadas y que en numerosas circunstancias constituyen: Un forraje, un alimento humano directo, una cerca o lindero, un control natural de malezas, una cobertura enriquecedora del suelo, un sombrío adecuado.

En la mayoría de los casos, la bondad de tales plantas se manifiesta simultáneamente en un beneficio o uso múltiple, cuyas modalidades de su empleo van desde la plantación homogénea, hasta su asociación con cultivos convencionales. El grupo de plantas conocidas como leguminosas se han venido utilizando, aunque en pequeña proporción, pues aún son poco conocidas muchas de las especies herbáceas, bejucoas, arbustivas y arbóreas de nuestras regiones selváticas.

La carencia de información sobre el uso y manejo de las especies arbóreas y arbustivas en los sistemas ganaderos ha limitado las prácticas sostenibles agropecuarias, que se reflejan en ampliación de la frontera agrícola e implementación de sistemas de producción extensivos, que

generan impactos ambientales negativos. Por tal razón, es necesario identificar especies con aptitud forrajera, mediante el rescate del conocimiento tradicional (Gallego, Morales y Vivas, 2011).

Trabajos en Silvopastoreo realizados por el Grupo de Investigación Agroforestería y biodiversidad Tropical, han mostrado sus efectos positivos sobre una producción ganadera ecológica. Los sistemas silvopastoriles como bancos de proteína, arboles dispersos en praderas y cercas vivas, principales arreglos evaluados en producción animal, han presentado incrementos en la producción de leche con un promedio de un 24% y ganancias de peso cercanas a 900 g/día (Chamorro, 2010; Broom, Galindo, Murgueitio, 2013).

Sin embargo, el número de especies leñosas en Trópico bajo vinculadas directamente en la investigación es mínima, comparada con la megadiversidad del País. Además, las experiencias de productores y campesinos, algunas de ellas ancestrales; demuestran que la aplicación de estos sistemas agroforestales con especies nativas, aportan beneficios productivos y además existe claramente efectos ambientales, y sociales.

Existe un número considerable de especies forrajeras arbóreas nativas adaptadas a un amplio rango de zonas agroecológicas y zonas de vida. Dentro de estas especies, algunas se han utilizado por décadas en linderos y como arboles maderables, y han sido reportadas por los productores y observaciones de los autores sobre ramoneo de los bovinos como el caso de *Pseudosamanea guachapele*. Por lo tanto, se plantea que es necesario en alianzas estratégicas iniciar un proceso de investigación sistemático con esta especie y generar conocimiento en sistemas silvopastoriles productivos y amigables con el ambiente en el bosque seco tropical.

Por lo tanto, se plantea que en conjunto con alianzas estratégicas del sector, se inicie procesos de investigación sistemática, en sistemas silvopastoriles productivos y amigables con el medio ambiente en el bosque seco tropical (BST) con esta especie. En virtud que *P guachapele* presenta bondades como: reportes de ramoneo, capacidad para fijar nitrógeno, calidad nutricional, capacidad de rebrote y aporte de sombra difusa; características que permiten explicar la respuesta animal, asociada con un mejor balance de nutrientes en el sistema silvopastoril (Cárdenas, Ángel, y Pérez, 2011).

Algunos suelos de los Valles interandinos son ácidos, con presencia de aluminio y bajo contenido de elementos nutricionales como P, K, Ca y Mg, los cuales son esenciales para las plantas (Jaramillo, 2002), lo que limita la incorporación de especies leñosas, además de la baja

disponibilidad de germoplasmas de leñosas que se adapten a las condiciones edáficas contrastantes propias de suelos de estos valles.

En este contexto, los microorganismos benéficos del suelo específicamente los *rhizobium* y micorrizas interactúan con las raíces de las plantas, creando un ambiente dinámico que mejora la estructura y fertilidad del suelo, donde la simbiosis bacteria, hongo y planta se beneficia metabólicamente del reciclaje de nutrientes (Pedraza et al;2010).

Teniendo en cuenta lo anterior, desde un proceso sistemático de evaluación Agrozootecnica de especie leñosa como Iguá *Pseudosamanea guachapele* dada su gran cobertura en los Valles interandinos, es necesario incluir fases iniciales de investigación donde se evidencie su interacción con microorganismos, y evaluar integralmente esta leguminosa Arbórea, iniciando procesos de selección y escalamiento.

Por lo tanto, en la FASE I. se realizó la evaluación de variables dasométricas de las especies Iguá *Pseudosamanea guachapele* durante la fase de vivero bajo el uso de dos biofertilizantes (Micorrizas y *Rhizobium*). Este proyecto se enmarca en las líneas de investigación de la ECAPMA, Alimentación, Metabolismo y Nutrición Animal y Biodiversidad y Recursos Genéticos.

3. Justificación

Los sistemas agropecuarios tradicionales en los Valles interandinos, han disminuido su productividad de manera gradual y sistemática, efecto atribuido entre otros factores, a la pérdida de la capacidad productiva de los suelos, las bajas precipitaciones características de la región, baja disponibilidad de aguas para sistemas de riego, escasa cobertura y a la compactación de los suelos creando condiciones desfavorables para la producción ganadera debido a la baja capacidad de retención de humedad del suelo, lo cual se agudiza con las altas tasas de evapotranspiración ocasionando déficit hídricos considerables (de 1.000 a 1.500 mm por año) que conlleva a la deficiente producción y calidad de gramíneas y leguminosas forrajeras y el descenso marcado en la oferta de biomasa forrajera presentada en la época de sequía, conduce a la disminución en los indicadores de producción zootécnica y por consiguiente de los ingresos de los productores (Chamorro, 2002).

La disponibilidad y calidad del forraje en oferta, está limitada por diversos factores como lo son los cambios climáticos, la distribución de las precipitaciones, la composición de los suelos, la calidad nutricional y adaptación de las especies y el manejo de las praderas. La baja producción zootécnica de los bovinos en el bosque seco tropical está directamente asociada con el mayor contenido de pared celular, el menor porcentaje de proteína y la menor digestibilidad, que origina un menor consumo voluntario de la materia seca, no satisfaciendo los requerimientos nutricionales en las fases productivas de alta demanda de nutrientes, lo cual causa estacionalidad en la producción de leche y carne, afectando la rentabilidad de las empresas ganaderas (Fonseca, 2007; Chamorro, 2002) .

Debido a estos problemas ambientales de clima y suelo que presenta el bosque seco tropical, se requiere de la utilización de alternativas de bajo costo, que mejoren la oferta de alimento en época de sequía, con la optimización de plantas forrajeras arbóreas con alto potencial de rendimiento en calidad, producción y resistencia a las sequías.

Para lograr la sostenibilidad y la productividad de los sistemas de producción del trópico bajo, estos deben estar directamente relacionados con el manejo y producción de recursos forrajeros que le proporcione mayor disponibilidad y calidad de materia seca, para lo cual se debe incorporar al sistema leguminosas arbóreas forrajeras, las cuales mejoran la principal limitante para la producción animal como es el consumo voluntario durante la época de sequía (Chamorro, 1998).

Las actividades ganaderas requieren del uso directo de recursos naturales como el sol, el agua, el suelo y la flora. De la forma cómo los use y aproveche el ganadero, dependerá la intensidad, calidad y duración de esta actividad fundamental para la economía, la alimentación, el desarrollo regional y la cultura.

La iniciativa de incluir árboles en potreros se implementa para disminuir los costos de producción, reducir los riesgos de plagas en los pastos, ayudar a prevenir la erosión en las áreas pendientes y mejorar las condiciones actuales de los suelos. Cuando la población de árboles leguminosos como guamos, algarrobillos, acacias, búcaros o trupillos está entre 25 a 40 individuos por hectárea, se logra una reducción cercana al 30% en la fertilización nitrogenada (Moreno et al; s.f).

Adicionalmente, se reducen los costos de labranza y adecuación de suelos compactados, se incrementa la productividad y sostenibilidad de las fincas ganaderas al permitir la intensificación en la producción de forrajes y mejoramiento de la dieta, permitiendo la alimentación y suplementación estratégica animal a lo largo del año o en épocas críticas.

En los meses sin lluvias la mayoría de los árboles leguminosos nativos fructifican, llegando a aportar entre el 20% y el 50% de la materia seca consumida por el ganado, en forma de legumbres ricas en energía y proteína de alta digestibilidad. Además, suministran sombra para el ganado disminuyendo el estrés calórico y haciéndolo más eficiente en la producción de carne, leche o crías (Chamorro y Rey, 2008).

Por tal razón, es importante realizar investigaciones enfocadas a la caracterización botánica y nutritiva de las leguminosas nativas arbóreas, con el fin de evaluar su potencial forrajero y calidad nutritiva ya que la investigación se ha limitado a investigar en pocas especies destacándose las arbóreas, *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Erythrina poeppigiana* y *Prosopis juliflora*.

Teniendo en cuenta lo anterior, se requiere en el bosque seco tropical, investigar y evaluar nuevos recursos leguminosos leñosos, e iniciar procesos de selección y escalamiento de algunas especies nativas que han demostrado por su presencia en estos ecosistemas su gran adaptación, este es el caso de la especie Iguá *Pseudosamanea guachapele* especie muy distribuida en Colombia, Ecuador, México, Islas del Caribe y usada tradicionalmente como proveedor de postes para cercas, por lo anterior, es necesario iniciar la investigación desde la fase de vivero y potencializar su desarrollo aéreo y radicular con la identificación de sus microsimbiontes, por medio de procesos de aislamiento y su posterior aplicación como biofertilizantes; como es el caso del *Rizobio* y las Micorrizas que pueden fijar nitrógeno y, solubilizar y absorber del fósforo respectivamente, incrementando el crecimiento vegetal, (Mosse, 1981). La fijación del nitrógeno por las bacterias del género *Rhizobium* es un proceso que requiere de energía en forma de ATP (Jones, 1974), por lo que la micorriza que comúnmente se hallan en simbiosis con las leguminosas, pueden aumentar la absorción del fósforo debido a la capacidad de estas estructuras para solubilizar el fósforo capturado en un mayor volumen de suelo explorado; transfiriéndolo luego a la raíz del hospedero (Asimi, Gianinazzi-Pearson, & Gianinazzi, 1980).

La especie *Pseudosamanea guachapele* se distribuye desde el sureste de México hasta Ecuador, crece entre los 0-1.500 m.s.n.m; principalmente en el Bosque seco Tropical (Bs-T); en el departamento de Antioquia es frecuente encontrarlo en el cañón y valle del bajo cauca y vertiente oriental de la cordillera occidental. Su madera es de color amarillo, medianamente dura, muy empleado en ebanistería y construcciones; se le considera recuperador de suelos y forrajero; por su porte y copa es propicio como ornamental en zonas urbanas muy amplias como parques, retiros de quebradas, glorietas y zonas amplias (Alcaldía de Medellín, 2011).

Es importante anotar que el Grupo de investigación Agroforestería y biodiversidad tropical, ha generado estrategias para los ecosistemas del bosque seco tropical, basado en sistemas silvopastoriles multiestrato sometidos a un manejo integrado tendiente a incrementar la productividad en donde el árbol juega un papel esencial en la relación suelo-planta-árbol-animal-ambiente, porque además de aportar al sistema proteínas y minerales, mejoran el funcionamiento del ecosistema microbial del rumiante favoreciendo la degradación de la fibra e incrementando el consumo voluntario de materia seca reflejado en mayor productividad y sostenibilidad de las empresas ganaderas.

Además, de generar tecnologías en Silvopastoreo, que se convirtieron en un modelo regional dada la participación del Sector oficial y privado asociado con la ganadería en Campoalegre, Huila, municipio representativo del Valle cálido del Magdalena. Asimismo, realizando procesos de observación de la regeneración natural y el consumo voluntario de la especie *Pseudosamanea guachapele* en sistemas silvopastoriles establecidos en asocio con *L. leucocephala*, *G. sepium* en praderas de *P. purpureum* y *Megathyrus maximus*.

Un estudio comparativo de la calidad forrajera de varias especies del género *Albizia* mostró que las hojas del Iguá tienen un 24% de proteína (Stewart & Dunsdon, 2000). La facilidad con que el iguá regenera en los pastizales lo convierte en una especie muy útil para la rehabilitación ecológica de tierras degradadas, la restauración de bosques y una fuente de proteína.

Una fase inicial de este programa de investigación con Iguá es evaluar el efecto de la biofertilización y fertilización química sobre variables dasométricas de *Pseudosamanea guachapele* en fase de vivero, identificando los microorganismos simbióticos con énfasis en *Rhizobium* y micorrizas que se asocian a esta especie, de manera que se haga un uso más eficiente de la capacidad genética de producción y calidad de biomasa de esta leguminosa, incluyendo estos microorganismos con un manejo integral, de recuperación de suelos, disminución de costos de producción y mayor calidad y producción de la oferta de biomasa a los rumiantes.

Por lo anterior, esta investigación está enfocada a la optimización en calidad y producción de forraje de la especie Iguá *Pseudosamanea guachapele*, como árbol multipropósito, por medio de la práctica de inoculación de hongos micorrícicos arbusculares nativos y cepas de *Rhizobium* nativas, para mejorar los valores nutricionales, disminuir costos de producción, sustituir en gran parte la fertilización química y ofrecer una mejor oportunidad de adaptación y supervivencia de *Pseudosamanea guachapele*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la doble inoculación de cepas nativas de *Rhizobium* y micorrizas asociadas con la especie *Pseudosamanea guachapele* sobre variables agronómicas y microbiológicas.

4.2 Objetivos específicos

- Recolectar, aislar e identificar cepas nativas de *Rhizobium* asociadas con la especie *Pseudosamanea guachapele* en Valles Interandinos.
- Evaluar la efectividad de las cepas de *Rhizobium* asociadas con micorrizas seleccionadas, sobre el desarrollo inicial en plantas de *Pseudosamanea guachapele*.
- Evaluar las variables agronómicas durante la fase de vivero bajo el uso de dos biofertilizantes (micorrizas y *Rhizobium*) comparado con un fertilizante químico.

5. Marco teórico

5.1 Modelo de leguminosas y leñosas

En un ensayo preliminar de evaluación nutricional del Iguá *Pithecellobium guachapele* del Huila, reportan niveles de proteína del 17 al 24%, niveles de fenoles inferiores al 6%, FDN y FDA de 63 y 37, respectivamente y concluyen que el Iguá es una forrajera de muy buena calidad nutricional para ser usada en la alimentación de rumiantes (Cárdenas, Ángel y Pérez, 2011).

Según (Rojas y Suarez 2015; Morales y Sarmiento 2008), el Iguá *Pseudosamanea guachapele* (Kunth), es un árbol nativo de la zona de Bosque seco tropical, del departamento del Huila, del cual actualmente, sólo se aprovecha la madera de plantas de 20 a 30 años, para la fabricación de construcciones rurales como estantillos en potreros y/o linderos, vigas, tablas, tablones, etc.

Es importante mencionar que, además, de la buena calidad nutricional del forraje, excelente palatabilidad, capacidad de fijación de nitrógeno, la especie *Pseudosamanea guachapele* por la rápida degradación de las hojas en el suelo, se puede incluir en los sistemas de producción como abono verde (Rey, Chamorro, Correa y Rodríguez, 2011).

En países como “Costa Rica se ha usado en plantaciones de pequeña escala (<200 ha) para madera de aserrío y en el Salvador puede encontrarse como árbol de sombra en cafetales” (CATIE, s.f) y en general se encuentra surcando las fuentes de agua.

Según Noboa (2016), al describir la ecología del Iguá, indica que su distribución natural abarca desde México hasta Bolivia (incluyendo Surinam y Venezuela y Ecuador). El hábitat en el que se encuentra es: elevaciones de 0-800 metros. Sin embargo, se ha plantado hasta una altitud de 1200 m. Esta especie no es capaz de tolerar mal drenaje o las inundaciones. Se desarrolla en suelos fértiles cerca de los ríos, la temperatura media anual: 20 - 40 °C. La media de precipitación anual: 700 - 2300 mm de suelo. Esta especie es caducifolia por lo que requiere una temporada seca anual de aproximadamente 4-5 meses. Puede alcanzar 30 metros de altura, con troncos

de más de 30 cm de diámetro a la altura del pecho.

La corteza es la característica más notable de este árbol, de color gris muy claro y además está cubierta de grandes y llamativas placas de tejido muerto como flecos. De hojas compuestas, pinnadas y alternas, grandes, de hasta 30 centímetros de largo, cubiertas en su cara posterior por un finísimo terciopelo de color amarillento (Alcaldía de Medellín, 2011; Noboa, 2016).

Las flores poseen largos y abundantes estambres de color blanco o crema, se desarrollan en grupos o inflorescencias grandes. Los frutos son legumbres secas y aplanadas de color café oscuro. Dentro de cada fruto podemos encontrar de 5 a 10 semillas pequeñas en forma de frijoles. El número de semillas por kilogramo está entre 23000 y 29000 semillas/kg. La madera esta lista desde 20 a 40 años. Es usado para arte y hacer muebles y las vainas sirven de comida para venado, y ardillas (Noboa, 2016).

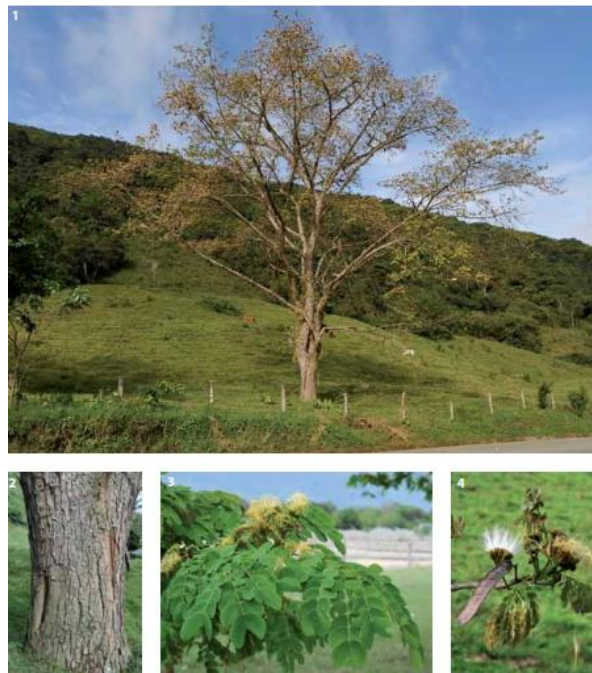


Figura 1. Individuo adulto en la vía Medellín - Santa Fe de Antioquia (1), Corteza (2). Ramas y flores (3), Fruto y flores (4)

Fuente: (Alcaldía de Medellín, 2011)

Como afirma Chamorro et al; (2007) esta especie crece en zonas subhúmedas y secas, siendo dominante en el paisaje de terrazas sobre el Magdalena en el Departamento del Huila y Tolima, y abundante en el cañón del Cauca y en Antioquia. Las hojas son un forraje para el ganado de alta calidad, palatables con un 24% de proteína.

Aunque por el momento no son usadas ampliamente en América para este propósito, este uso tiene un enorme potencial. Las hojas se descomponen rápidamente por lo que pueden ser usadas también como abono verde aunada a su capacidad de fijar nitrógeno. Se conocen algunos análisis del valor nutricional donde los contenidos de proteína cruda son de 24%, materia seca de 34%, FDN del 63%, FDA del 37% y una degradabilidad del 68.2%, confirmando su potencial forrajero (Cárdenas, Ángel y Pérez, 2011).

Además, se ha implementado en varios sistemas silvopastoriles, donde alcanza excelentes aportes. En rotación de praderas de (42 a 45 días) el Iguá se mantiene, demostrando su capacidad de rebrote y resistencia al ramoneo; a partir de estas observaciones crece la expectativa, como una especie promisoría en sistemas silvopastoriles para ramoneo, no obstante se deben realizar evaluaciones, del manejo agrozootécnico para incluirla en sistemas silvopastoriles (Hernández, 20011).

En la actualidad es creciente el interés por incorporar a la actividad agropecuaria, de una manera más intensiva, un mayor número de especies de leguminosas considerando su potencial de fijación de nitrógeno, este aspecto es importante, especialmente, en regiones donde por el uso inadecuado de la tierra y/o la intensidad de cultivo, la cantidad de nitrógeno en el suelo presenta niveles críticos.

En el trópico colombiano existe una gran riqueza biológica de especies de leguminosas, muchas de ellas poco conocidas en cuanto a sus potencialidades y usos. El Convenio CONIF-HOLANDA, incluye dentro de sus programas de investigación especies de leguminosas asociadas a cultivos agrícolas. En este contexto inició estudios de identificación de leguminosas naturales en tres diferentes regiones de Colombia (Guaviare, Urabá y Medio Atrato-Chocó) examinando sus características como fijadoras de nitrógeno y otras particularidades, y su posible uso en actividades de índole agroforestal (Múnevar, 1982).

En una investigación realizada en el estado de Río de Janeiro (Brasil). Se midió el depósito de hojarasca y la transferencia de nitrógeno en cultivos homogéneos de Iguá (*Pseudosamanea guachapele*) y eucalipto (*Eucalyptus grandis*) y en cultivos mixtos de ambas especies, siete años

después de establecidos. La producción anual de hojarasca no tuvo diferencias significativas entre los tres arreglos forestales: 12,75 t/ha para Iguá, 11,84 t/ha para eucalipto y 12,44 t/ha para las plantaciones mixtas. Sin embargo, cuando se combinan las dos especies, la hojarasca del Iguá acelera en cuatro meses la incorporación de los residuos del eucalipto al suelo, en comparación con lo que ocurre en la plantación homogénea (de Carvalho Balieiro et al; 2004).

Algunos otros atributos interesantes de este árbol son su capacidad de rebrotar después de las quemas, buen crecimiento y tolerancia a temporadas secas, alta producción de biomasa forrajera de buena calidad, alta rentabilidad financiera para pequeños, medianos y grandes productores, Cobertura total del suelo durante todo el tiempo que reduce al mínimo los procesos erosivos superficiales por acción del agua y el viento, reducen el consumo de madera para postes porque se utilizan cercas y cintas eléctricas, exigen un manejo cuidadoso del agua de abrevadero lo que obliga al ganadero a proteger y mejorar este recurso natural imprescindible, ayudan a reducir la carga de parásitos internos por la ruptura de ciclos de vida con la rotación y por el efecto de los metabolitos secundarios del Iguá, es un sistema ideal para alcanzar las metas de buenas prácticas ganaderas y luego la producción orgánica certificada para los nuevos mercados de leche y carne (Murgueitio et al; 2011).

También ayudan a reducir la carga de parásitos internos, al romper su ciclo de vida con la rotación de praderas, además del efecto de los metabolitos secundarios del Iguá. También es una alternativa ideal para implementar en buenas prácticas ganaderas, que certifican una producción orgánica para el mercado de leche y carne (Murgueitio et al;2011).

5.2 Marco Conceptual

5.2.1 Modelo biofertilizantes

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) interactúan simbióticamente con el 80 % de las familias de plantas terrestres en las cuales son capaces de formar Micorrizas Arbusculares (MA), encontrándose en casi todos los ecosistemas terrestres (Smith & Read, 2008).

Las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas; prácticamente universales entre algunos hongos y raíces de las plantas. Esta interacción mutualista brinda un beneficio para el hongo y para la planta en la cual, el hongo se considera la parte más activa metabólicamente en

la absorción de nutrientes para la planta y ésta a su vez aporta al hongo nutrientes orgánicos (fuentes de carbono) procedentes de productos fotosintéticos y un hábitat ecológicamente protegido en la rizósfera (Azcón & Barea, 1980). Los hongos micorrízico arbusculares poseen tres componentes principales que son: la raíz de la planta hospedera, las estructuras formadas en el córtex radicular (arbúsculos, o vesículas) y el micelio o esporas extraradicales (Espinoza, 2014).

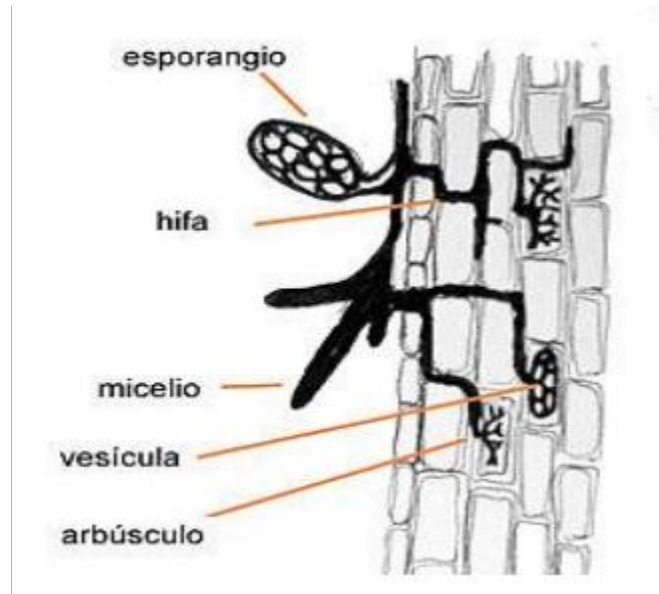


Figura 2. Partes de la micorriza

Fuente: (Espinoza Antor, 2014)

En forma general, los beneficios que representa esta asociación para la planta son muchos y muy variados, una de las funciones más importante para la planta está relacionada con aspectos nutricionales ya que, desde el punto de vista de la planta se aumenta la superficie de absorción de la raíz de tal forma que está puede absorber y asimilar más agua y nutrientes minerales como los elementos poco móviles del suelo: K, Zn, S, Ca, Mo, B y principalmente el nitrógeno y el fósforo (en forma de órgano-fosfatos) (Molina, Mahecha y Medina, 2005; Khalil, Gardezi, Márquez y Ayala, 2015).

Además, de otros beneficios ligados a los nutricionales que estimula el crecimiento por la absorción de nutrientes no asimilables por la planta especialmente en suelos con bajos contenidos de nutrientes, como los son: detoxificación de los minerales pesados, reciclaje de nutrientes, tolerancia a condiciones de estrés hídrico, mayor tolerancia de la planta a patógenos

por la resistencia de la planta a enfermedades radicales (Guadarrama y Sánchez, 2004). Además, de inducir la síntesis de hormonas vegetales, ya que incrementan la capacidad de absorción de agua a través de las hifas aumentado su tolerancia a la sequía y aumenta la eficiencia de otros simbiontes como *Rhizobium* (Alarcón y Ferrara, 1999).

El hongo a su vez toma los carbohidratos (producto de la fotosíntesis) los cuales son necesarios para su desarrollo, esto lo hace por medio de las células meristemáticas de los pelos radicales de la raíz de la planta. En consecuencia, la micorriza es una adaptación biológica que favorece a las plantas en su nutrición mineral, balance hídrico y desarrollo vegetal (Azcón & Barea, 1980).

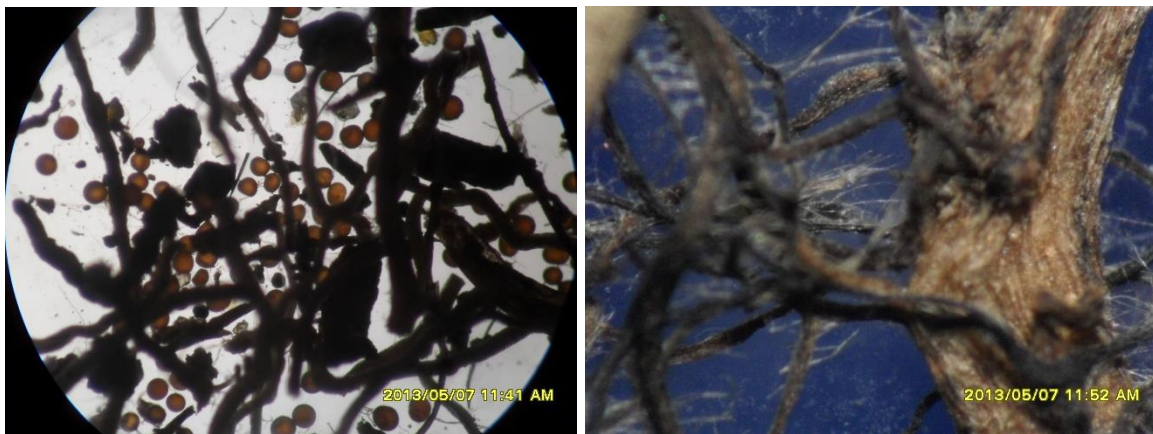


Figura 3. Esporas e hifas y raicillas micorrizadas asociadas con Iguá *Pseudosamanea Guachapele*.

Fuente: El autor.

El fósforo después del Nitrógeno es el elemento que participa en la nutrición de las plantas, este se encuentra en el suelo de forma orgánica como inorgánica con baja disponibilidad para las plantas; algunos microorganismos son capaces de solubilizar el fósforo convirtiéndolo en asimilables para las plantas, dentro de los que se destacan Hongos y bacterias (Perez, De la Ossa y Montes, 2012).

La forma de liberación del fósforo pasa por un proceso de meteorización, lixiviación, erosión y extracción industrial como fertilizante de los depósitos de apatitas y depósitos naturales de fosfato (Aristizabal y Cerón, 2012).

Se debe tener presente que el fósforo, a diferencia del nitrógeno, es un elemento prácticamente inmóvil en el suelo por lo que su absorción por parte de las raíces depende de la capacidad de

exploración de estas últimas. En este sentido, la micorrización proporciona una superficie de absorción incrementada y más eficaz (Coyne & Rasskin, 2000).

Arévalo y Moreno (2014) afirman. “El ciclo del fósforo comienza con los iones de fosfatos disueltos, las plantas lo absorben a través de sus raíces y lo distribuyen en todas las células. A su vez, los animales lo adquieren al ingerir los vegetales. Al morir las plantas y los animales a través de sus excretas liberan fósforo insoluble y las bacterias que solubilizan fosfato transforman el fósforo en fosfatos inorgánicos disueltos” . Parte de estos compuestos son distribuidos por escorrentías, aves y otros animales terrestres, completando así el ciclo.

Los hongos a través de la producción de ácidos disuelven los minerales a ácidos orgánicos (glicólico, láctico, cítrico, maléico) (Perez, De la Ossa, y Montes, 2012), acidificando el suelo y facilitando la absorción del fósforo para las plantas (Corrales, Arévalo y Moreno, 2014).

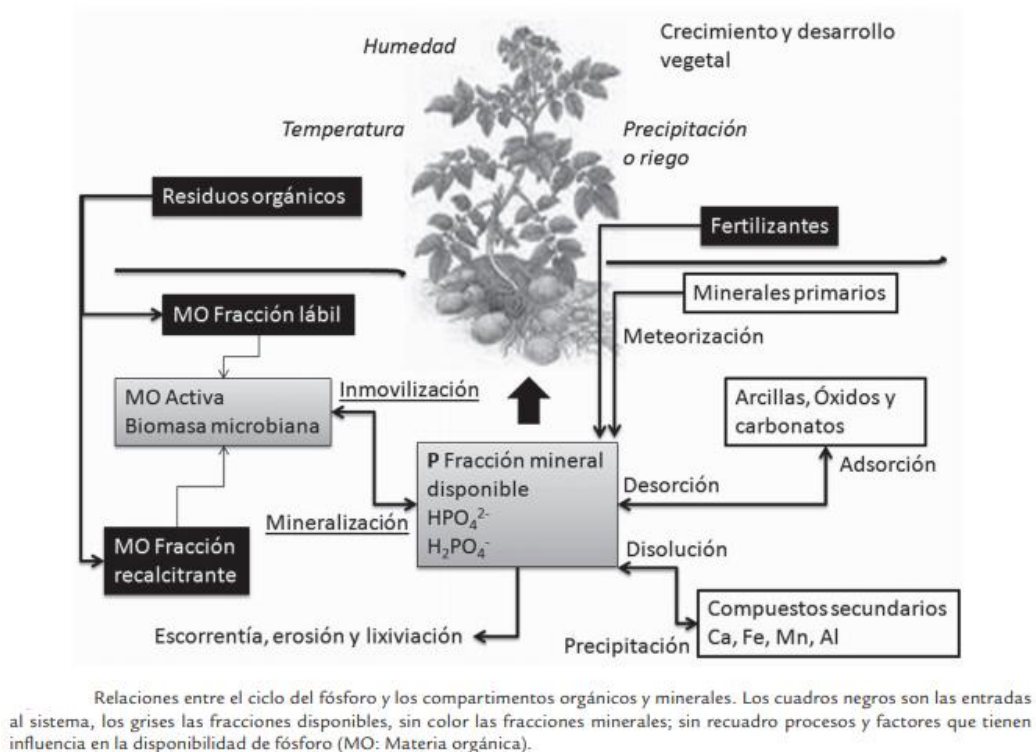
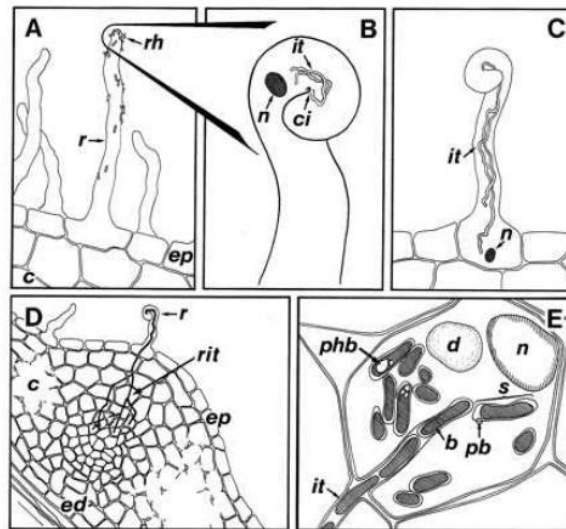


Figura 4. Dinámica del Fósforo.

Fuente: (Aristizabal Gutierrez & Cerón Rincon, 2012)

Los rizobios, son bacterias del suelo, caracterizadas por su habilidad para infectar leguminosas e inducir la formación de nódulos fijadores de N_2 en las raíces, aunque en algunos casos los

nódulos se forman en los tallos como en *Sesbania* y *Aeschynomene* (Posada, 2005, p 185). Son bacilos Gram negativos no esporulados, aunque se tornan pleomorfos en ciertas condiciones de crecimiento, son heterótrofos, aerobios móviles por la presencia de flagelos peritricos o polares (Rivera, 2012). La habilidad las cepas de formar nódulos determina la infectividad y la de fijar nitrógeno se denomina efectividad. Para la fijación de nitrógeno el *Rhizobium* obtiene la energía que requiere de la fotosíntesis (carbohidratos) que intercambia con la planta, gracias a su localización dentro de la planta. (CIAT, 1987); (Iñon).



Invasión de pelos radicales por *Rhizobium* sp. (A) rizobia (*rh*) coloniza la rizósfera y se adhiere al pelo radical (*r*). (B) “Factores Nod” inducen el ensortijamiento del pelo radical y permiten la penetración bacteriana al centro de infección (*ci*). El núcleo del pelo radical (*n*) precede el crecimiento del hilo de infección (*it*). (C) El hilo de infección alcanza la base del pelo radical (*it*), aún acompañado del núcleo (*n*) (D) El pelo radical (*r*) se ramifica (*rit*) cerca del primordio nodular formado por las células corticales en división. (E) Los bacteroides (*b*) son liberados desde el hilo de infección (*it*) y forman simbiosomas (*s*) donde se acumulan gránulos de poly-hidroxibutarato (*phb*) rodeados por la membrana peribacteroidal (*pb*). Otras abreviaturas: *c*, corteza; *d*, vacuola digestiva; *ep*, epidermis; *ed*, endodermis (Perret *et al.*, 2000).

Figura 5. Formación de un Nódulo.

Fuente: (Mayz Figueroa, 2004)



Figura 6. Morfología del Nódulo de Iguá *Pseudosamanea Guachapele*.

Fuente: (Mora de Gonzalez, 1983).



Figura 7. Raíz con presencia de Nódulos asociados con Iguá *Pseudosamanea Guachapele*.

Fuente: El autor.

Las bacterias del género *Rhizobium* son Gram negativas y aerobias obligadas que pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*. Entre ellos se encuentran los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Estos microorganismos del suelo forman una asociación simbiótica con distintas especies de plantas, y durante la simbiosis son capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno molecular (Mendez, 2010).

Hay varias especies de *Rhizobium* las cuales se diferencian en cuanto a las leguminosas que les sirven de hospederos; de aquí se desprende que no todas las especies de *Rhizobium* pueden

nodular efectivamente cualquier leguminosa. La capacidad para causar nodulación y fijar nitrógeno, está relacionada con el pH del suelo, la especie de leguminosa, la bacteria y el clima. Otro limitante son el aluminio y las altas temperaturas (Paredes, 2013).

Debido a que en muchos casos las poblaciones nativas de *Rhizobium* son infectivas, se ha puesto en práctica la inoculación de semillas de leguminosas con *Rhizobium* efectivos y compatibles. Las especies correspondientes a géneros catalogados como potencialmente fijadoras no son descartables, puesto que ameritan un análisis más exhaustivo respecto de la cepa de *Rhizobium* que tienen sus nódulos, si es efectiva o sólo infectiva.

De ocurrir el último caso, es necesario a través de un mayor muestreo y de ensayos de laboratorio llegar a encontrar la especie de *Rhizobium* efectiva a la especie. Se indica lo anterior por cuanto siendo el color rojo el indicativo de presencia de leghemoglobina, supone fijación de nitrógeno en forma efectiva; sin embargo, hay tonalidades que como la carmelita oscura o el color anaranjado aportan dudas en el análisis de coloración que presentan los nódulos al efectuar un corte con cuchilla (Mora, 1983).

Algunas bacterias, por ejemplo, *Azotobacter* que vive libre en el suelo, y *Rhizobium* que crece como simbiote en los nódulos de la raíz de leguminosas, así como cianobacterias, pueden fijar el nitrógeno gaseoso de la atmósfera, es decir reducirlo convirtiéndolo en nitrógeno orgánico. Por otra parte, las formas parásitas obligadas obtienen del hospedador los complejos constituyentes de su materia viva, de acuerdo con (Phaff, 1981) citado por (Carrillo, 2003).

El ciclo bioquímico del nitrógeno comprende una serie de procesos microbiológicos químicos y físicos en el cual ocurren varias transformaciones simultáneas y en diverso sentido, en las que participan componentes orgánicos, inorgánicos y volátiles. El proceso de fijación del nitrógeno atmosférico molecular o dinitrógeno (N_2), inicia con la reducción a la forma amoniacal por la intervención de la enzima nitrogenasa, la cual permite la reducción de N_2 a nitrato (NO_3) o iones de amonio (NO_4), y otros sustratos, como lo es el acetileno (C_2H_2), el cual es reducido a etileno (C_2H_4) (Mayz, 2004).

En el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico que se encuentra en forma molecular (N_2), se reduce a la forma amoniacal por la intervención de la enzima nitrogenasa es la que permite la reducción de N_2 a nitrato (NO_3) o iones de amonio (NO_4), y otros sustratos, como lo es el acetileno (C_2H_2), que es reducido a etileno (C_2H_4) (Mayz, 2004).

Este importante elemento fertilizante, no se comporta en el suelo del mismo modo como la mayoría de los demás nutrientes. En la naturaleza, el nitrógeno pasa por un incesante ciclo de cambios, partiendo del Nitrógeno libre en la atmósfera, éste puede ser fijado por una descarga eléctrica o por las bacterias simbióticas (*Rhizobium*), de esta manera es utilizado como alimento o nutriente por las plantas. La fijación biológica de N₂ contribuye con aporte de minerales al sistema suelo-planta esencial para la fertilidad del suelo y la productividad (Cerón y Aristizábal, 2012).

El nitrógeno puede llegar a formar parte del suelo de varias maneras, a saber: a) por procesos químicos como la oxidación de nitrógeno atmosférico por acción de rayos solares, descargas eléctricas, lluvias acidas. b) Por fijación biológica del Nitrógeno (Pellegrini, 2017).

La fijación biológica de nitrógeno consiste en la conversión del nitrógeno atmosférico por acción de un microorganismo a una forma combinada que puede ser utilizada por la planta, directa o indirectamente. Por ejemplo, algunos microorganismos de vida libre o asociaciones simbióticas entre plantas y microorganismos participan en la fijación biológica del nitrógeno. Algunas plantas que participan en la fijación de nitrógeno, la cual se realiza por acción de microorganismos en vida libre, o por asociaciones simbióticas entre plantas y microorganismos. La fijación de nitrógeno por asociación de plantas leguminosas con bacterias *Rhizobium* es el sistema más importante, sin desconocer el de la asociación simbiótica de plantas no leguminosas con bacterias del género *Frankia*, en los cuales también hay formación de nódulos (Múnevar, 1982).

Richardson y col. (2009) evaluaron en un suelo bajo en fósforo asimilable, la inoculación de *Leucaena leucocephala* con *Glomus fasciculatum* y dos cepas eficientes de *Rhizobium* sp. Los resultados mostraron que la doble inoculación mejoró el crecimiento de la planta y el rendimiento de biomasa seca, en comparación con la variante sin inoculación.

La producción de nódulos en las plantas de *Pseudosamanea guachapele* es la respuesta a la infección producida a través de una cepa específica presente en el suelo o mediante una cepa específica inoculada en estas plantas. Sin embargo, no todas las cepas de *Rhizobium* son capaces de producir una fijación simbiótica efectiva en todas las leguminosas y pueden mostrar diferentes habilidades para nodular cuando son inoculadas, para ello es necesario hacer investigaciones para seleccionar las cepas de *Rhizobium* de mayor efectividad y asociación con *Pseudosamanea guachapele*.

Por esta razón el presente trabajo está orientado a identificar, y evaluar la efectividad de

micorrizas arbusculares y la simbiosis de bacterias diazotróficas del género *Rhizobium* en la especie Iguá *Pseudosamanea guachapele* especie que se incluirá en fases avanzadas de evaluación en sistemas silvopastoriles multiestrato del Bosque seco Tropical (Bs-T).

6. Metodología

6.1 Localización

El ensayo se realizó en el invernadero de la finca Villa Elena del corregimiento El Hatillo, el cual se encuentra ubicada en el Municipio de Barbosa (Antioquia), a 36 kilómetros de la ciudad de Medellín, Situado en el extremo norte del Valle de Aburra sobre la margen derecha del río Medellín en una estribación de la cordillera de los Andes. El municipio de Barbosa hace parte del Área Metropolitana y es paso obligado hacia el nordeste del departamento, Magdalena Medio, Santanderes, la Costa Norte, Venezuela y sirve como vía alterna con la capital del país. La zona se clasifica como bosque húmedo premontano 1.300 m.s.n.m; con Temperatura promedio de 25°C y una precipitación promedio anual de 2.000 mm.

Limita al oriente con el Municipio de Santo Domingo, al occidente con el Municipio de Girardota, al norte con el Municipio de Don Matías y al sur con los municipios de Concepción y San Vicente.

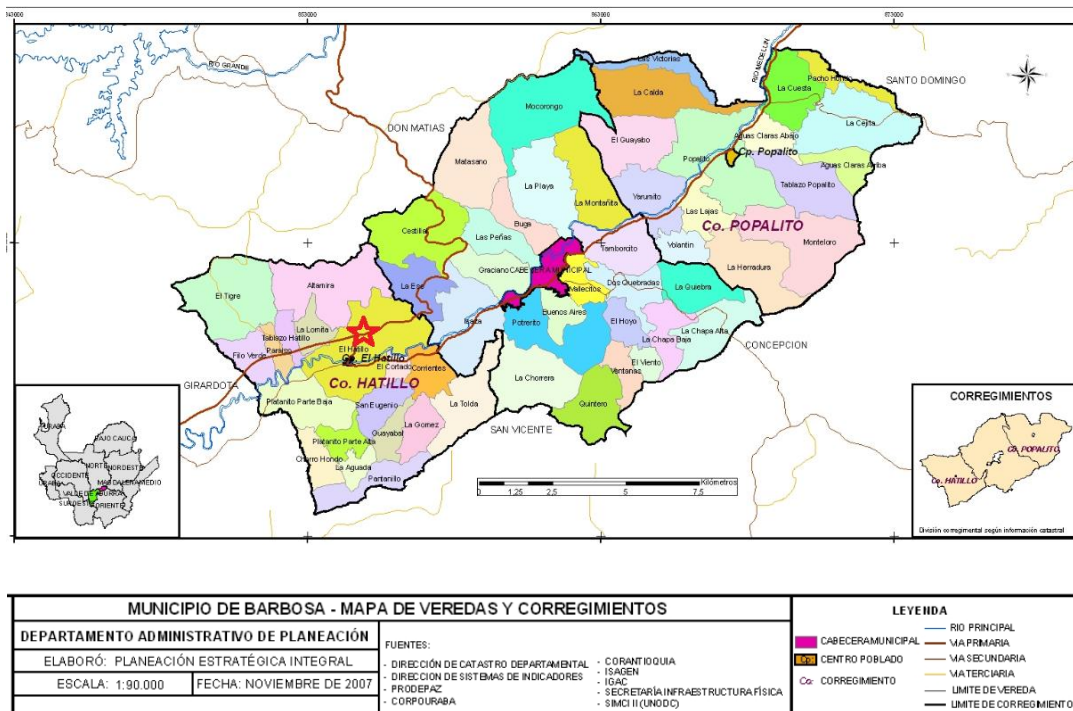


Figura 8. Mapa del Municipio de Barbosa (Antioquia).

Fuente: (Saldarriaga, 2007).

Las muestras de suelo recolectadas para el aislamiento fueron llevadas a los laboratorios de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia sede de Medellín, donde se realizaron los aislamientos y multiplicación de las cepas de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* e identificación de las micorrizas asociadas a la especie en investigación.

6.2 Recolección de muestras

Las muestras de Micorrizas y *Rhizobium* se recolectaron de suelo rizosférico y raíces nodulares de poblaciones naturales de la zona de influencia de *Pseudosamanea guachapele*, de la vía San Jerónimo (Antioquia), las muestras de suelo se utilizaron para realizar los análisis fisicoquímicos iniciales del ensayo. Se recolectó suelo, raíces y nódulos de tamaño grande a mediano de la parte superior de la raíz principal.

En todos los casos se escogieron plantas vigorosas en la etapa de floración, sin indicios de ataque de plagas o enfermedades. Los nódulos fueron conservados en tubos con silica gel y algodón (Rey, Chamorro y Ramírez, 2005).

6.3 Materiales

Tubos tapa rosca de 10 ml, silica gel, algodón, bolsas plásticas, pala, nevera, desecador.

6.4 Procedimiento de muestreo

En las áreas seleccionadas se forma una capa superficial de aproximadamente 20 cm de profundidad, en la cual se entretejen las raíces del árbol que compiten eficientemente con otras especies vegetales.

Se obtienen bloques de 20 cm por cada lado y 20 cm de profundidad a 50 cm de la base de cada uno de los árboles seleccionados.

Se recolectaron aproximadamente 1500g de suelo los cuales se homogenizaron, se retiró las raíces para tinción y se extrajeron dos submuestras de 300g y 500g para aislamiento y conteo

de esporas, y para análisis físicos y químicos respectivamente, y el suelo restante se lleva a 5°C en nevera para su conservación.

6.5 Análisis de muestras

6.5.1 *Rhizobium*

6.5.2 Muestreo y preservación de nódulos

6.5.3 Materiales

Tubos con cierre hermético, Algodón, Sílica Gel Con Indicador de Humedad.

6.5.4 Procedimiento

Se ubicó en el fondo del tubo (1/3) sílica gel seca (color azul) y una mota de algodón. Se recolectaron las raíces de leguminosas en el campo y se guardaron, previa identificación, en bolsas plásticas. Es recomendable dejar suelo rizosférico recubriendo las raíces para evitar resecamiento de los nódulos. Una vez en el laboratorio se lavaron bien las raíces y se separaron cuidadosamente los nódulos, según (Rey, Chamorro y Ramírez, 2005).

Se recolectaron nódulos que no presentaban daños de insectos, enfermedades o heridas, preferiblemente de tamaño mediano y grande. En cada tubo se colocaron nódulos de una sola planta. La sílica gel se cambió cada vez que tomó coloración rosada debido a la absorción de la humedad (Rey, Chamorro y Ramírez, 2005).

Los datos que se utilizaron para la identificación de los nódulos fueron: Fecha de recolección, lugar de recolección, altura sobre el nivel del mar, datos climáticos del lugar, características del suelo, características de la ondulación (tamaño de nódulos, coloración interna número de nódulos, distribución en la raíz etc.) y nombre del recolector.

6.5.5 Aislamiento de cepas de *Rhizobium*

6.5.6 Materiales

Solución salina estéril 0.85 %, etanol 95%, hipoclorito de sodio agua destilada estéril, cajas de Petri con medio levadura manitol agar (LMA) y agar Rojo Congo, placas de vidrio o cerámica.

6.5.7 Procedimiento

Los nódulos fueron lavados y se separaron cuidadosamente de la raíz, y fueron almacenados en tubos con sílica gel. Para la esterilización se colocaron los nódulos en solución salina (0.85%) por un lapso de media hora. Luego se sumergieron los nódulos en una solución de etanol 70% (v/v) por un periodo de 10 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua estéril, con una duración de 1 min cada uno (CIAT, 1985).

Los nódulos previamente esterilizados fueron macerados con 5 ml de agua destilada estéril en un mortero previamente esterilizado. Posteriormente, se tomó 1 ml del macerado y se diluyó con agua destilada estéril hasta obtener diluciones de 10^1 a 10^7 . De cada dilución se estrilaron 500 μ l sobre cajas Petri que contenían medio de cultivo levadura manitol agar (LMA) y medio libre de nitrógeno (NFB) y fueron incubadas a 27° durante 15 días.

A partir del cultivo inicial se realizaron aislamientos hasta obtener un cultivo puro de *Rhizobium*. Y se llevaron las cepas a prueba de caracterización microscópica y macroscópica para su subsiguiente inclusión en el Banco de Cepas. Se obtuvo 150 ml de inóculo con una concentración $2,46 \times 10^9$ ufc de bacterias fijadoras de nitrógeno, según métodos descritos por (CIAT, 1985).

6.5.8 Identificación de *Rhizobium*

6.5.9 Tinción de Gram

La pureza se comprobó por tinción de Gram. Las cepas se conservaron en el mismo medio LMA con rojo Congo a 4°C. Para la identificación del género *Rhizobium* se utilizó la técnica de tinción de Gram, la cual permitió observar la característica de Gram-negativas y las diferentes morfologías presentadas por las bacterias.

Se realizó la prueba de confirmación, la cual consistió en tomar muestra del cultivo en un portaobjeto y se le agregó una gota de azul de bromotimol, si se observa un cambio a amarillo se comprueba la presencia de *Rhizobium*, en caso negativo corresponde a *Bradyrhizobium*. Las colonias circulares, secas, rara vez translúcidas, blancas, convexas y tienden a ser granulosas son características de *Bradyrhizobium*. Según Wang et al; (2001) en *Bradyrhizobium* se agrupan bacterias de crecimiento lento, cuyas colonias miden menos de 1 mm entre los 5 y 7 días de ser incubadas permitiendo ver la morfología, coloración y purificación de las cepas.

6.5.10 Procedimiento

Se recolectó una pequeña muestra de la colonia y se esparció suavemente sobre la lámina de forma tal que quedo cubierta en un área de un centímetro o dos centímetros de diámetro, se dejó secar al aire y se fijó pasando rápidamente la lámina sobre el mechero. Se adicionaron, unas gotas de solución de cristal violeta y se dejó de 30 a 60 segundos, luego se lavó con agua. según métodos descritos por (CIAT, 1985).

Luego se adicionaron unas gotas de solución Lugol y deajo por 30 a 60 segundos, se lavaron con agua. Se decolora el preparado con alcohol (95%) por 10 a 30 segundos, aplicando el alcohol hasta que la preparación deja de liberar cristal violeta y se lavó inmediatamente con abundante agua, se adiciono una gota del colorante fucsia por 10 segundos y se lavó de nuevo, se dejó secar y se observó al microscopio. según métodos descritos por (CIAT, 1985).

Para determinar la morfología de las bacterias aisladas se realizó la tinción de Gram y se observó al microscopio óptico. Las características culturales y la tasa de crecimiento se determinaron sembrando las cepas en medio LMA, con rojo congo, a pH 6.8 y se incubó durante 10 d a 28 °C

6.5.11 Selección de cepas inoculadas

Se escogieron las cepas de *Rhizobium* de acuerdo con los siguientes parámetros:

1. Cepas nativas de mayor crecimiento asociadas con la especie *Pseudosamanea guachapele*;
2. Alta efectividad,
3. Alta infectividad,
4. Adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la zona.

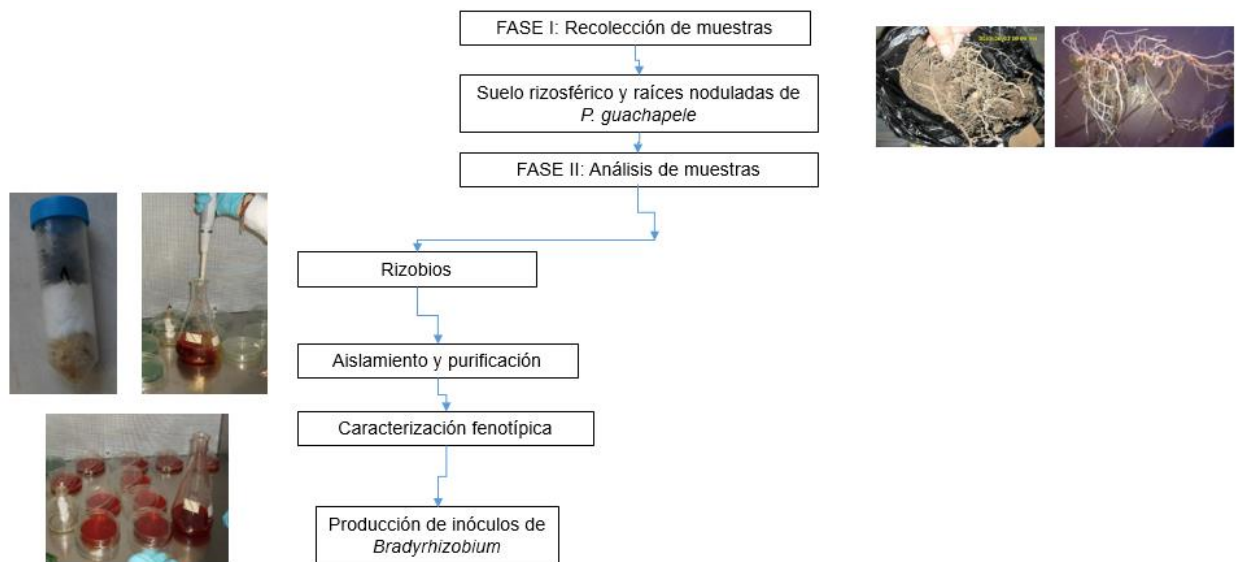


Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de muestreo, preservación y aislamiento y producción de *Rhizobium*.

Fuente: El autor.

6.5.12 Número y peso de nódulos de *Rhizobium*

Desde el tercer mes de muestreo se realizó el conteo de nódulos, peso verde y seco.

Inicialmente se extrae la tierra de la raíz con el fin de poder observar los nódulos y así realizar el conteo. Luego se separan los nódulos de la raíz para ser lavados y posteriormente pesados. Para tomar el peso seco de los nódulos, estos se guardan en sobres de papel, los cuales se llevan a secar en un horno a una temperatura de 60°C por 48 horas. Pasado este tiempo se pesan los nódulos en una balanza de precisión. El pesaje de los nódulos secos debe ser inmediatamente se retiran del horno, para evitar errores por rehidratación. (Rivero, Giraldo y Graham, 1976).

6.6 Micorrizas

6.6.1 Micorrizas arbusculares

Se utilizaron Micorrizas de Safer micorrizas arbusculares (M.A) las cuales contenían una mezcla de esporas, micelio y propágulos de *Glomus fasciculatum*, *Scutellospora heterogama*, *Glomus mosseae*, *Glomus manihotis*, *Acaulospora rugosa* y *Entrophospora colombiana*, el inoculante contenía 300 esporas/g.

6.6.2 Aislamiento y conteo de esporas

6.6.3 Materiales

Centrífuga, Tamiz de 38 μm y 400 μm , Beaker, Tubos plásticos Falcón de 45 ml.

Reactivos: Peróxido de Hidrógeno, Solución de tween 80 al 2% más sacarosa 2M, Polinivil Lactoglicerol.

6.6.4 Procedimiento

El método que se utilizó fue el de (Gerdemann & Nicolson, 1963), con algunas modificaciones. Esta metodología se basa en suspender 10g de suelo en agua agitar por unos 10 minutos y pasarlo por unos tamices de malla descendente (400, 250, 100 y 38 μm) con la finalidad de aislar las esporas, luego se le adiciona con una jeringa una solución de sacarosa 2M con tween 80 al 2% de manera que este quede suspendido con el material recolectado y se lleva a centrifugación a 2800 rpm durante 10 minutos. Se saca cuidadosamente el tween y se lleva al tamiz de menor diámetro con una malla de 38 μm , se lava con agua corriente para quitar el exceso de sacarosa, se transfieren las esporas y el material retenido en el tamiz a el papel de filtro en un embudo, recolectando así la muestra que se pasó a una caja de Petri para hacer el conteo.

Después de tener las esporas en una caja Petri con una grilla de 5 mm x 55 mm y manteniendo húmedo las esporas, se procede a realizar el conteo utilizando un estereoscopio.

6.6.5 Tinción de raíces y determinación del porcentaje de infección de los hongos MA en raíces de *Pseudosamanea guachapele*

6.6.6 Materiales

Tubos Plásticos Falcón de 10 ml, Baño María, Beakers.

Reactivos: Hidróxido de Potasio al 10% (KOH), Peróxido de Hidrógeno al 10% (H₂O₂), Ácido Clorhídrico 1N, Lacto Glicerol, Azul de Trypan 0.05%.

6.6.7 Procedimiento

Se utilizó la metodología de tinción con azul de Trypan descrita por (Phillis & Hayman, 1970) modificado por (Koske & Gemma, 1989). Se lavaron las raíces con agua corriente, se colocaron en el baño María a 90°C con KOH por 15 minutos. Se lavaron y se sumergieron en KOH al 10% y H₂O₂ al 10% mezclando solución 1:1 (v/v) de 5 a 10 minutos dependiendo de la raíz. Se lavó de nuevo y se sumergieron en la solución de HCl al 1N por 10 minutos se retiraron de la solución y se llevaron al azul de Trypan por 12 horas, se sacaron, se lavaron y se montaron en láminas con glicerina, se taparon con una laminilla y se llevaron para su posterior observación.

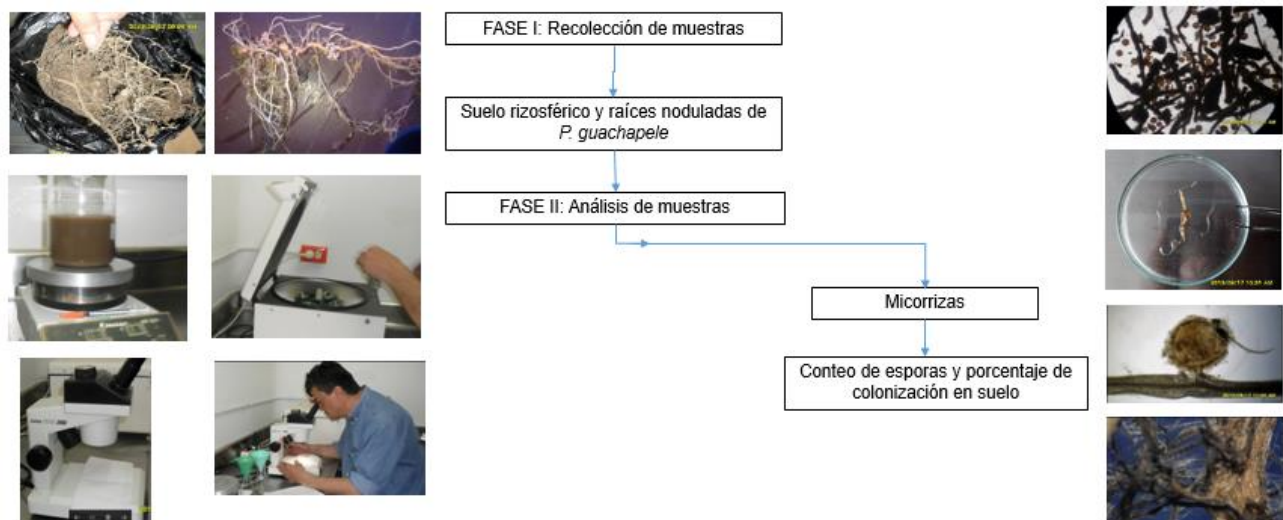


Figura 10. Diagrama de flujo del proceso de aislamiento, conteo de esporas y colonización.

Fuente: El autor.

6.7 Semillas

Las semillas de *Pseudosamanea guachapele* fueron recolectadas en el Centro Agropecuario la Angostura SENA CALA de Campoalegre - Huila.

6.7.1 Proceso de desinfección

Las semillas vienen acompañadas por organismos capaces de causar infección una vez entren en contacto con algún medio que le de los nutrientes y la humedad necesaria para crecer. Por ello es necesaria una desinfección superficial utilizando diversas soluciones. Para la desinfección se sumergen las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos.

6.7.2 Proceso de escarificación

Las semillas de *Pseudosamanea guachapele* tienen una cubierta impermeable por lo que es preciso utilizar métodos de escarificación para asegurar la germinación *in vitro* rápida y uniforme. El proceso de escarificación permite romper la tensión superficial de la semilla y logra mayores porcentajes de germinación. Para el proceso de escarificación, se sumergió la semilla en agua estéril a 80°C por 3 minutos Según (CORANTIOQUIA, 2005).

6.8 Sustrato

Como sustrato se utilizó una mezcla comercial que contenía suelo, gallinaza, cal y cascarilla de arroz, procedente de la empresa Vivero Tierra Negra S.A.S. Una vez listo el suelo se siembran las semillas según los tratamientos, por un tiempo de cuatro meses y se evaluaron las variables. Según (Rey, Chamorro y Ramírez, 2005).

6.9 Pruebas de inoculación en vivero

6.10 Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar, con siete tratamientos y tres repeticiones por tratamientos. Los datos se recolectaron a los 30, 60, 90 y 120 días después de la siembra. Se analizó la respuesta a la inoculación a través de: *Variables agronómicas* altura (cm), longitud de

raíz (cm), peso verde basal (g), peso verde de raíz (g), peso seco basal (g), materia seca basal (%), peso seco de raíz (g), materia seca de raíz (g), diámetro basal (mm). *Variables Microbiológicas*: Número de nódulos, peso nódulos verdes (g), peso nódulos secos (g), número de esporas y porcentaje de colonización por la técnica de azul de tripan (Phillis & Hayman, 1970). La información fue procesada mediante el programa SAS (1997). La comparación de medias fue realizada acorde a la prueba de Tukey.

6.10.1 Tratamientos:

- T1:** Cepas de Micorrizas (Safer) 50 g + Cepa de *Bradyrhizobium* 2ml + semilla de *Pseudosamanea guachapele*
- T2:** Cepas de Micorrizas (Safer) 50 g + semilla de *Pseudosamanea guachapele*
- T3:** Cepas de Micorrizas (Safer) 100 g + Cepa de *Bradyrhizobium* 2ml + semilla de *Pseudosamanea guachapele*
- T4:** Cepas de Micorrizas (Safer) 100 g + semilla de *Pseudosamanea guachapele*
- T5:** Cepa de *Bradyrhizobium* 2ml + semilla de *Pseudosamanea guachapele*
- T6:** Semilla de *Pseudosamanea guachapele* + Fertilización con N y P, (Fosfato diamónico)
- T7:** Testigo, Semilla de *Pseudosamanea guachapele* sin inocular.

Bloques = 3

(T1): Micorrizas, 50g + *Bradyrhizobium* 2ml /planta

(T2): Micorrizas 50g

(T3): Micorrizas, 100g + *Bradyrhizobium* 2ml /planta

(T4): Micorrizas 100g

(T5): *Bradyrhizobium* 2ml /planta

(T6): Fertilización con niveles medios de N y P, 40 g

(T7): Semilla sin inocular

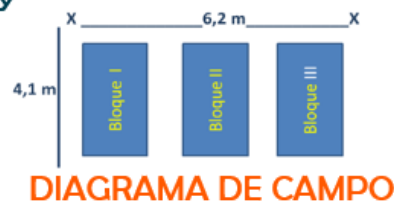
-Muestras= Mensuales (4)

-Replicas de campo= 3

-Bolsas de un kilo, (bolsas cafeteras)

-Análisis de datos SAS

-Prueba de comparación de medias Tukey



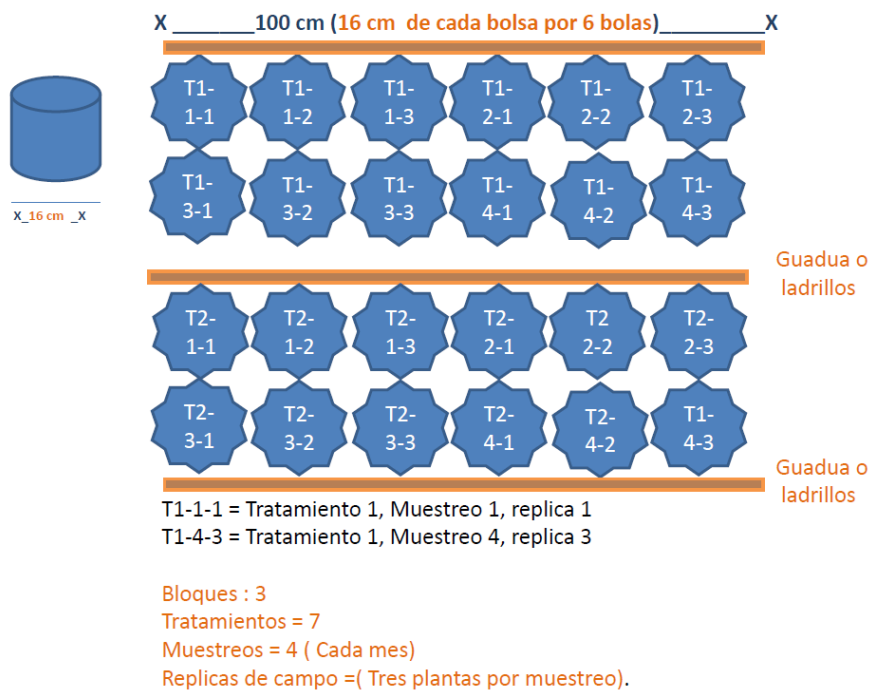


Figura 11. Diagrama de campo para el montaje del experimento.

Fuente: El autor.

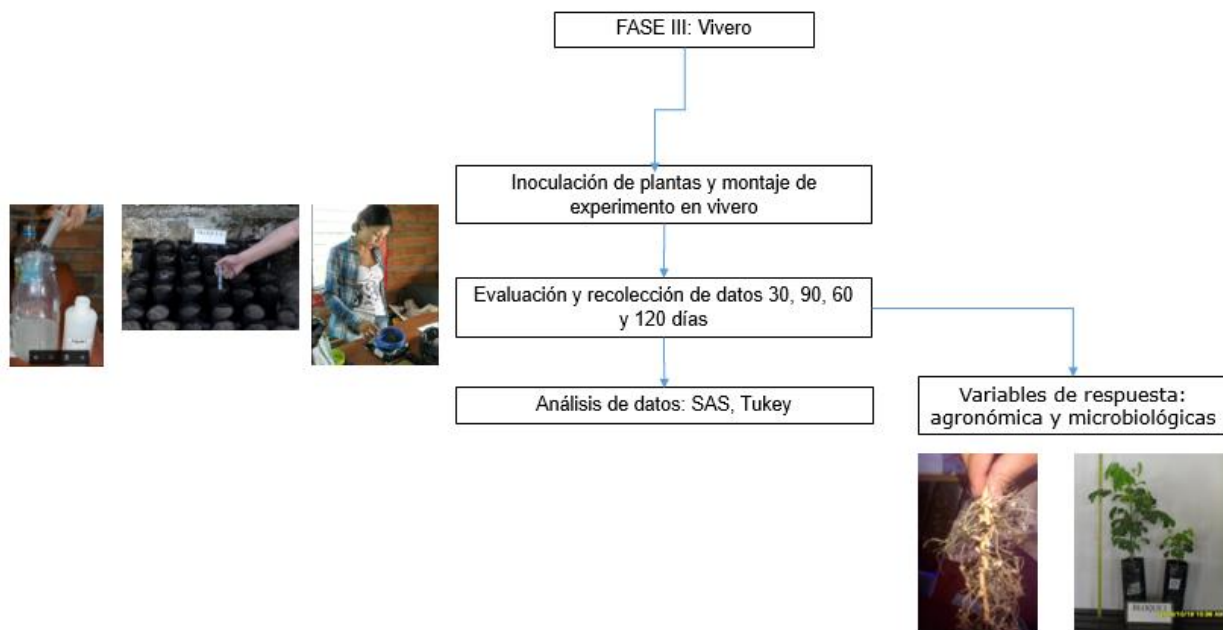


Figura 12. Diagrama de flujo del proceso de campo y recolección de información.

Fuente: El autor.

6.11 Variables

Variables Dependientes:

Agronómicas:

Altura (cm), diámetro basal (mm), presencia de plagas, peso verde y seco en hojas, tallos y planta completa. Longitud y peso verde y seco de la raíz, metodología modificada para los Ensayos Regionales B (ERB), de (Toledo & Schultze, 1982).

Microbiológicas:

Se cuantificará la incidencia micorrítica a través del aislamiento y conteo de esporas, según la metodología planteada por (Gerdemann & Nicolson, 1963) por la metodología de tinción con azul de Trypan descrita por (Phillis & Hayman, 1970) modificado por (Koske & Gemma, 1989) y Número y peso de nódulos.

6.12 Análisis de datos

La información fue procesada mediante el programa SAS (1997). La comparación de medidas fue realizada acorde a la prueba de Tukey.

6.12.1 Pruebas de comparación con medias de Tukey

La prueba (Honestly-significant-difference) de Tukey es una prueba de comparaciones múltiples. Permite comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la Hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA.

7. Resultados y discusión

7.1 Variables agronómicas.

En la Tabla 1 se muestra la comparación de medias según la prueba de Tukey, de las variables agronómicas Altura (cm), Longitud Raíz (cm) y el Diámetro basal (mm) estrechamente asociadas al crecimiento de la planta, como efecto a los tratamientos evaluados.

Tabla 1. Respuesta a la inoculación y fertilización química sobre la Altura (cm), Longitud Raíz (cm) y el Diámetro basal (mm)

Tratamiento	Altura planta (cm)				Longitud Raíz (cm)				Diámetro Basal (mm)	
	Días									
	30	60	90	120	30	60	90	120	90	120
Significancia	**	ns	**	**	**	ns	**	*	*	**
T1	5,57 ^{ab}	8,63	16,57 ^a	38,67 ^a	5,22 ^b	7,04	26,12 ^a	37,66 ^a	0,24 ^a	0,27 ^a
T2	5,39 ^{ab}	7,20	14,82 ^a	34,62 ^a	4,78 ^b	7,811	24,68 ^a	33,89 ^{ab}	0,21 ^{ab}	0,28 ^a
T3	4,49 ^{ab}	8,09	12,37 ^{bc}	38,96 ^a	5,23 ^b	8,80	25,66 ^a	38,44 ^a	0,19 ^b	0,29 ^a
T4	3,29 ^c	7,31	13,24 ^{bc}	40,01 ^a	3,91 ^b	6,60	26,40 ^a	41,33 ^a	0,19 ^b	0,28 ^a
T5	5,82 ^a	8,12	13,57 ^{bc}	35,38 ^a	5,56 ^{ab}	8,94	25,39 ^a	34,44 ^a	0,21 ^{ab}	0,27 ^a
T6	4,44 ^{bc}	8,44	11,88 ^c	25,17 ^b	5,31 ^b	6,933	14,33 ^b	22,33 ^b	0,18 ^b	0,19 ^b
T7	5,92 ^a	8,70	13,67 ^{bc}	36,53 ^a	7,21 ^a	9,511	24,35 ^a	32,22 ^a	0,18 ^b	0,28 ^a

(T1): Micorrizas 50 g + *Bradyrhizobium* (T2): Micorrizas 50 g (T3): Micorrizas 100 g + *Bradyrhizobium* (T4): Micorrizas 100 g (T5): *Bradyrhizobium* (T6): Fertilización con N y P (DAP); (T7): Testigo sin inocular.

** Diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), * Diferencias significativas ($P < 0.05$), ns no existen diferencias. Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

7.1.1 Crecimiento de las plantas.

Se presentaron diferencias altamente significativas a los 30, 90 y 120 días ($P > 0.01$) en la variable altura (Tabla 1). A los 30 días de evaluación los tratamientos T5 y T7 presentaron las mayores alturas.

A los 90 días fueron los tratamientos T1 y T2, está dinámica de crecimiento fue consistente en la respuesta que se obtuvo a los 120 días en la cual los tratamientos inoculados se caracterizaron por presentar alturas constantes con valores que fluctuaron entre 34,5 y 40 cm. Con estos

resultados podemos afirmar, como la biofertilización con micorrizas ayuda al crecimiento y nutrición de las plantas; además de mejorar la actividad del *Rhizobium*, como afirma (Quilambo, 2003).

Se demuestra, la efectividad de los biofertilizantes para formar simbiosis individual o doble entre micorrizas y *Rhizobium*, la cual se observó en un mejor desarrollo en la variable altura, en las plantas inoculadas, respuesta asociada como afirma Gonzales et al; (2012) y Barea et al; (1992) a que la infección de micorrizas incrementa el suministro de fosforo y así favorece la fijación de nitrógeno por medio de la simbiosis con *Rhizobium*, superando el desarrollo con el tratamiento con fertilización química.

Por otra parte, la asociación mutual de Micorrizas y *Rhizobium* con las plantas inoculadas ayudo al mejor crecimiento de las plantas, posiblemente al aumentarse los nutrientes, por una mejor absorción de las raíces ayudadas por la micorriza, además del aporte que hace el *rhizobium* como promotor de crecimiento (Parkash & Aggarwal, 2009 ; Ahmed 2003).

Como mencionan (Nadeem, Ahmad, Zahir, Javaid, & Ashraf, 2014; Quilambo, 2003; González, Núñez y Barceló, 2012) la coinfección de rizobacterias y micorrizas son promotoras del crecimiento inicial de las plantas, debido a mecanismos como la fijación de nitrógeno y la solubilización del fósforo.

La asociación simbiótica de Micorrizas y *Bradyrhizobium* con las plantas inoculadas ayudó a mejor el crecimiento de las plantas. Posiblemente, al haberse aumentado la disponibilidad de nutrientes por una mejor absorción de las raíces ayudadas por la micorriza. Además, del aporte que hace el *Bradyrhizobium* como promotor de crecimiento las plantas lograron mejores indicadores de crecimiento (Parkash & Aggarwal, 2009; Ahmed & Thakore, 2003). Es importante anotar que el tratamiento con fertilización química (T6) presentó los menores crecimientos en la variable altura durante todo el periodo de evaluación.



Figura 13. Evaluación de variable altura muestreo al cuarto mes.

Fuente: El autor.

Así mismo, se observó que en los estados tempranos la inoculación con microorganismos generó una sinergia positiva, que impactó sobre el crecimiento de las plantas, lo que fue correspondiente con las respuestas microbiológicas obtenidas en los tratamientos con biofertilizantes a los 90 y 120 días (Tabla 4).

El efecto en el crecimiento inicial de las plantas que se obtuvo en los tratamientos con la inoculación se asocia con los mecanismos de fijación de nitrógeno y solubilización del fósforo generado entre las rizobacterias y micorrizas (Meng, Zhang, Wang, Han, & Wang Dejiang, 2015).

Se conoce que en la etapa de asociación de la simbiosis no hay intercambio de metabolitos hacia la planta, por el contrario se produce el drenaje de carbono hacia el hongo y ocurre una disminución en la velocidad de crecimiento del hospedero (Dodd et al; 1996), por lo que al parecer, las especies *Glomus fasciculatum*, *Scutellospora heterogama*, *Glomus mosseae*, *Glomus manihotis*, *Acaulospora rugosa* y *Entrophospora colombiana* en estas condiciones necesitan más tiempo para establecerse en la raíz y comenzar el proceso simbiótico.

El tratamiento sin inoculación T7, evidenció la dependencia que presenta *P. guachapele* en generar asociaciones simbióticas mutualistas con especies nativas de microorganismos nativos del suelo (rizobios y micorrizas) (Tabla 4), lo cual impactó de manera positiva en las variables asociadas al crecimiento de las plantas. Todo esto parece confirmar, que los simbiosiontes

obligados nativos presentaron algún grado de dependencia o susceptibilidad de la planta a la colonización y nodulación, donde el aporte metabólico en su establecimiento, desarrollo y nutrición promovió el crecimiento de las plantas (Requena, 1996).

7.1.2 Longitud de raíz.

El análisis de varianza indico diferencias significativas y altamente significativas a los 30, 90 y 120 días. A los 30 días los tratamientos T5 y T7, presentaron las mayores longitudes con 5,56 y 7,21 cm respectivamente.



Figura 14. Evaluación variable longitud de raíz muestreo al cuarto mes.

Fuente: El autor.

En los últimos periodos de evaluación se presentó una tendencia similar entre los tratamientos inoculados, que fue más frecuente en aquellos tratamientos con doble inoculación. La asociación con micorrizas y rizobios estimulan el crecimiento de las raíces, debido producción de exudados que favorecer la permeabilidad (Sarabia, Madrigal y Carreón, 2013; Crush, 1974).

Por su parte las micorrizas proporcionan un incremento y eficacia de las raíces, traducido en mayor superficie de raíz, mayor capacidad de exploración y absorción de nutrientes (López, Espinoza y Caballero, 2005; Tajini, Trabelsi, & Drevon, 2012).

En la variable desarrollo radicular el tratamiento T6 con fertilización química presentó los menores crecimientos durante el periodo de evaluación. Asociado posiblemente a toxicidad por acumulación de fertilizantes o a un aumento en la concentración de aluminio e hidrogeno (Alzugaray, Haase & Rose, 2004), así mismo, de perdida de nutrientes por lixiviación, además de producirse una menor penetración de las raíces al subsuelo debido a la obtención de la fertilización localiza, traducido en menor crecimiento radicular y por ende menor exploración de suelo para capturar nutrientes (Douglass, 2001).

7.1.3 Diámetro Basal

El diámetro basal fue medido a los 90 y 120 días, y presentó diferencias significativas y altamente significativas en los tratamientos evaluados. A los 90 días los tratamientos T1, T2 y T5 mostraron las mayores respuestas. En efecto, se observó como la inoculación de micorrizas y *Bradyrhizobium* incrementaron el grosor del tallo, involucrando en cierta medida, la acción de la fijación de nitrógeno, producción de hormonas, aumento del desarrollo radical; traducido en mayor toma de agua y nutrientes (Zamorano, 2015) citando a partir de (Bashan y de Bashan, 2010; Souchie et al, 2006; Van der Heijden et al; 2006; Constantino, Gómez, Álvarez, Pat-Fernández Y Espín, 2010), además de , reducir hasta en un 50% el tiempo utilizado para cultivar en el vivero las plantas y poder realizar su trasplante al campo con mayor grosor de tallo como lo experimento (Aguirre et al;2011) en su investigación con café. De igual manera, el diámetro basal es una variable que mide la capacidad de transporte de agua hacia la parte aérea, de la resistencia mecánica y de la capacidad relativa de tolerar altas temperaturas de la planta, y los tratamientos con biofertilizantes presentaron los mayores valores.

Al final del periodo de evaluación todos los tratamientos inoculados y el tratamiento control, superaron al tratamiento con fertilización química, donde podemos inferir posiblemente, que un aumento de la acidez del suelo del T6, inhibió procesos de asimilación de nutrientes, reflejándose en el mínimo valor del diámetro de tallo (Prieto, Orjuela y Cárdenas, 2005), ya que la relación, de los efectos de los fertilizantes en características químicas del suelo, residuos, aumento de aluminio, deficiencia de algunos minerales, entre otros, ejercen una influencia en la productividad, respuesta de las plantas al adicionar nutrientes y en su desarrollo físico (Sadehgian, 2004; Morón, 2000) . Una de las principales funciones del tallo es el transporte de agua y nutrientes, almacenamiento de asimilado y sostenimiento de las partes aéreas de la planta, por lo anterior el diámetro basal, es frecuentemente utilizado en los estudios forestales ya que presenta altas relaciones con variables de producción, que permite observar y determinar el desarrollo fenológico en campo de especies forestales (Rey, Chamorro y Ramírez, 2005).



Figura 15. Evaluación variable diámetro basal en las unidades experimentales.

Fuente: El autor.

El efecto de la inoculación sobre las variables de respuesta peso verde (g), peso seco (g) y materia seca basal (%) de las unidades experimentales durante los cuatro muestreos, se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Respuesta a la inoculación y fertilización química sobre el crecimiento basal

Tratamiento	Peso Verde Basal (g)				Peso Seco Basal (g)				Materia Seca Basal (%)			
	Días											
	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
Significancia	*	**	**	*	*	ns	**	*	ns	**	**	*
T1	0,14 ^{ab}	0,20 ^b	1,36 ^a	6,14 ^a	0,019 ^{ab}	0,07	0,36 ^a	2,08 ^a	14,15	37,87 ^a	26,47 ^a	36,40 ^a
T2	0,13 ^{ab}	0,16 ^b	1,15 ^{ab}	5,14 ^{ab}	0,016 ^{ab}	0,06	0,31 ^{ab}	1,47 ^{ab}	13,08	38,44 ^a	27,38 ^a	28,84 ^a _b
T3	0,11 ^{ab}	0,24 ^b	0,83 ^{bc}	7,22 ^a	0,018 ^{ab}	0,07	0,22 ^{bc}	2,22 ^a	17,64	30,46 ^{ab}	26,14 ^a	30,48 ^a _b
T4	0,09 ^b	0,17 ^b	0,82 ^{bc}	7,65 ^a	0,011 ^b	0,06	0,22 ^{bc}	2,37 ^a	13,46	35,37 ^a	27,55 ^a	30,69 ^a _b
T5	0,14 ^{ab}	0,19 ^b	0,88 ^{bc}	5,46 ^{ab}	0,022 ^a	0,06	0,23 ^{bc}	1,64 ^{ab}	16,07	34,09 ^{ab}	26,31 ^a	29,86 ^a _b
T6	0,13 ^{ab}	0,35 ^a	0,78 ^c	2,85 ^b	0,016 ^{ab}	0,08	0,17 ^c	0,77 ^b	13,99	23,87 ^b	21,21 ^b	26,17 ^b
T7	0,16 ^a	0,18 ^b	0,73 ^c	5,30 ^{ab}	0,022 ^a	0,06	0,19 ^c	1,58 ^{ab}	14,14	33,71 ^{ab}	26,05 ^a	29,54 ^a _b

(T1): Micorrizas 50 g + *Bradyrhizobium* (T2): Micorrizas 50 g (T3): Micorrizas 100 g + *Bradyrhizobium* (T4): Micorrizas 100 g (T5): *Bradyrhizobium* (T6): Fertilización con N y P (DAP); (T7): Testigo sin inocular.

** Diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), * Diferencias significativas ($P < 0.05$), ns no existen diferencias. Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

7.1.4 Peso verde basal.

Los valores del peso verde basal oscilaron entre 0,09 a 0,16; 0,16 a 1,35; 0,73 a 1,36 y 2,85 a 7,65 g en los cuatro periodos de evaluación respectivamente. En esta investigación se presentaron diferencias significativas y altamente significativas en todos los periodos de evaluación.

Al inicio de la evaluación el menor peso fue obtenido por el tratamiento T4. A los 60 días el tratamiento con fertilización química manifestó el mayor peso verde basal con un valor de 0,35 g/planta, superando a los demás tratamientos.



Figura 16. Evaluación de las variables peso verde y seco basal.

Fuente: El autor.

A los 90 días el tratamiento con doble inoculación micorrizas-*Bradyrhizobium*, presentó el mayor valor con 1,36 g. superando en 74,3% y 86,3% a los tratamientos fertilización química y sin inoculación respectivamente, notando como la presencia de micorrizas y asociación con *Bradyrhizobium* parece aumentar la búsqueda, transporte y absorción de nutrientes, reflejado en mejores pesos verdes (Noda, 2009; Parkash & Aggarwal, 2009).

Al final del periodo de evaluación los tratamientos T1, T3 y T4 superaron al tratamiento con fertilización química, con valores de 6,14, 7,22 y 7,65 g. Según (Welbaum, Sturz, Dong, & Nowa, 2004), los consorcios bacterianos por inoculación, a medida que aumenta el tiempo de interacción, mejoran la fertilidad del suelo a través de la regulación de los ciclos biogeoquímicos e influyendo en la cinética de afluencia de nutrientes y agua. En efecto, el aumento en los pesos frescos podría estar influenciado por fitohormonas como las auxinas, las cuales al activar la división celular y en consecuencia, se da el crecimiento de diferentes órganos en la planta, como son las hojas (Pimienta, Zaudó y López, 2009) citando a (Walch et al; 2000), además de atribuir que la simbiosis micorrícica mejora la absorción de minerales del suelo (Pimienta, Zaudó y López, 2009 ;Constantino, Gómez, Álvarez, Pat, Espín, 2011) citando a (Barker y Tagu, 2000; Fitze et al; 2005).

7.1.5 Peso seco basal.

En el peso seco basal, se presentaron diferencias entre tratamientos a los 30, 90 y 120 días de evaluación.

Al inicio de la evaluación el T4 presentó el menor valor respecto a los demás tratamientos. A los 90 días los tratamientos T1 y T2 obtuvieron los mayores pesos con valores de 0,36 y 0,31 g respectivamente. A los 120 días de evaluación los tratamientos presentaron una tendencia similar superando al tratamiento con fertilización química.

Se observó como las plantas inoculadas con micorrizas y *Bradyrhizobium* permitieron un aumento del peso seco basal comparado con las plantas testigo, como también se observó en el experimento de (Tajini, Trabelsi, & Drevon, 2012) asociado al beneficio mutualista del *Bradyrhizobium* y las micorrizas que se benefician en la captura de nutrientes, procesos metabólicos, obtención de nitrógeno, fósforo y solubilización que se reflejó en las plantas inoculadas.

Los consorcios bacterianos, regulan los ciclos biogeoquímicos e influyendo en la cinética de afluencia de nutrientes y agua, permitiendo mayores indicadores de crecimiento vegetal (Welbaum, Sturz, Dong, & Nowa, 2004).

7.1.6 Materia seca basal.

La variable presentó las mejores respuestas a los 60, 90 y 120 días. Los tratamientos inoculados y sin inocular superaron al tratamiento con fertilización química. Se observó que el T1 con valores de 37, 26,47 y 36,4 g y el T2 obtuvo una mayor respuesta en la respuesta de esta variable.

La asociación con microorganismos no solo aumenta la biomasa vegetal, sino que influye en su distribución en la parte aérea de la planta. El estímulo de la captación de nutrientes y posterior translocación de éstos a la parte aérea propicia la transferencia de fotosintatos a la raíz y la mayor retención en la parte aérea, donde son utilizados en la producción de materia vegetal (Sarabia, Madrigal y Carreón, 2013).

El desarrollo de las plantas expresado en peso fresco, peso y materia seca radicular presentó diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados ($P < 0.01$) a los 90 y 120 días de evaluación.

Durante los primeros 30 y 60 días de evaluación no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, posiblemente porque es durante este tiempo donde se daba el establecimiento de la simbiosis. Este es un proceso que requiere de espacio-tiempo y señales específicas para garantizar el reconocimiento de los microorganismos. Además, que la aceptación es controlada por la planta a través de exudados de la raíz (Ramírez y Rodríguez, 2010; Sanjuán, 2001).

Como afirma Colon, Gutiérrez y Probanza (1999), citados por (Hernández, 2014) la simbiosis de las bacterias de *Rhizobium* y micorrizas favorecen el incremento de la biomasa aérea y radicular, además de mejorar la fertilidad del suelo, a través de la fijación biológica del nitrógeno beneficiada por el *Rhizobium*, la cual es estimulada por procesos microbianos en la transformación de la materia orgánica y reciclaje de nutrientes, enriquece y mejora la fertilidad del suelo.

Por otra parte, las micorrizas incrementan la actividad microbiana que además de inducir cambios fisiológicos comprendidos en un aumento de la tasa fotosintética y redistribución del carbono fijado, favoreciendo así la nutrición del suelo (Blanco y Salas, 1997; Ferrara y Alarcón, 2001).

Las raíces de los árboles en los sistemas silvopastoriles contribuyen y aportan de manera importante nutrientes al sistema por medio de la descomposición-mineralización de raíces, nódulos y exudación de nutrientes (Sylvia, Fuhrmann, Hartel, & Zuberer, 2004). La respuesta a la inoculación y a la fertilización química sobre el desarrollo radicular se indica en la Tabla 3.

El efecto de la inoculación sobre las variables de respuesta de pesos secos de raíz de las plantas, se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Respuesta a la inoculación y fertilización sobre el desarrollo radicular

Tratamiento	Peso Verde Raíz (g)				Peso seco Raíz (g)				Materia Seca Raíz (%)			
	Días											
	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
Significancia	ns	ns	**	**	ns	ns	**	**	ns	ns	**	**
T1	0,10	0,11	1,64 ^a	3,82 ^a	0,009	0,04	0,45 ^a	1,04 ^a	9,83	39,16	26,57 ^a	46,23 ^a
T2	0,12	0,12	1,26 ^{abc}	2,32 ^{ab}	0,013	0,05	0,35 ^{ab}	0,97 ^a	11,78	45,11	26,56 ^a	42,9 ^{abc}
T3	0,11	0,14	1,23 ^{abc}	2,75 ^a	0,008	0,05	0,35 ^{ab}	0,99 ^a	8,35	41,72	27,45 ^a	37,18 ^{bcd}
T4	0,10	0,11	1,21 ^{abc}	2,36 ^{ab}	0,007	0,05	0,34 ^{abc}	1,26 ^a	6,90	44,87	26,24 ^a	35,75 ^{cd}
T5	0,11	0,15	1,29 ^{ab}	2,41 ^{ab}	0,012	0,06	0,36 ^{ab}	0,84 ^{ab}	10,10	40,59	27,65 ^a	35,13 ^{cd}
T6	0,10	0,12	0,66 ^c	0,80 ^b	0,017	0,04	0,15 ^c	0,20 ^c	19,86	34,98	22,13 ^b	26,82 ^d
T7	0,15	0,14	0,86 ^{bc}	2,30 ^{ab}	0,013	0,05	0,22 ^c	0,67 ^{ab}	8,69	41,40	25,55 ^b	33,96 ^d

(T1): Micorrizas 50 g + *Bradyrhizobium* (T2): Micorrizas 50 g (T3): Micorrizas 100 g + *Bradyrhizobium* (T4): Micorrizas 100 g (T5): *Bradyrhizobium* (T6): Fertilización con N y P (DAP); (T7): Testigo sin inocular.

** Diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), * Diferencias significativas ($P < 0.05$), ns no existen diferencias. Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

7.1.7 Peso verde radicular.

Se observaron diferencias altamente significativas a los 90 y 120 días de evaluación. El tratamiento 1, inoculado con micorrizas y cepas nativas de *Bradyrhizobium*, presentó las mayores respuestas sobre el desarrollo radicular con 1,64 y 3,82 g respectivamente.



Figura 17. Procesamiento de raíces para posterior evaluación del peso verde radicular.

Fuente: El autor.

A los 90 días el T1 superó al tratamiento testigo (T7 0,86 g) y a la fertilización química (T6 0,66 g) con incrementos de 131 y 86% respectivamente; a los 120 días el tratamiento T1 superó al tratamiento T6 en un 377%, donde se asume que la asociación mutualista de las micorrizas y bacterias de *Bradyrhizobium* demuestran un importante desarrollo radicular de las plantas inoculadas.

Es importante anotar que estas asociaciones representan un complemento para el sistema radicular, el cual mejora las propiedades de absorción y crecimiento de la raíz (Torreogroza, Salamanca y Barea, 1992). Según (Ojeda, Herrera, Furrázola y Hernández, 2014) la eficacia de la simbiosis entre *Rhizobium* y micorrizas se refleja en un mejor desarrollo de las raíces y en crear un nicho protector en el suelo. Además, los hongos micorrizicos reducen la pérdida de agregados y mejoran la estabilidad del suelo (Van Der Heijden et al; 2006).

7.1.8 Peso seco radicular.

En la variable peso seco radicular, no se evidenciaron diferencias significativas a los 30 y 60 días de evaluación. Probablemente, es durante este tiempo que se da el contacto y penetración de los microorganismos con la planta, tiempo en el cual los beneficios para el hospedero, no se expresaron, en la variable de peso seco radicular. Como afirma (Catford et al;2003) citado por Juge et al; (2012) la doble inoculación puede inhibir sistemáticamente a uno de los simbioses, en donde esta inhibición puede explicarse por el origen común y características fisiológicas entre la simbiosis; donde la planta podría tener una señal alterada cuando se establece uno de los simbioses. Sin embargo, esta inhibición es transitoria, ya que al final del experimento se observó un aumento del peso seco radicular en plantas con doble inoculación.

Se observaron diferencias altamente significativas a los 90 días, donde se presentaron pesos radiculares que oscilaron entre 0,15 a 1,04 g. El tratamiento T1 presentó los mayores valores superando al tratamiento T6 en 530% y al T7 en un 104%. A los 120 días con diferencias altamente significativas se observó un efecto positivo a la inoculación, los tratamientos T1, T2, T3 y T4 presentaron el mayor desarrollo radicular, con valores de 1,04, 0,97, 0,99 y 1,26 g. notando como las plantas inoculadas con micorrizas y *Bradyrhizobium* presentaron mayor rendimiento de peso seco atribuido al mayor desarrollo radicular y captación de nutrientes al

tener mayor área de exploración del suelo (Hernández, 2014) que las plantas que se le aplicó fertilizante químico y las plantas testigo.

Así mismo, se observó como la sinergia entre *Rhizobium* y micorrizas fue positiva, presentado mejores resultados localizados a nivel de la raíz, a partir de un mejor desarrollo de raíces y de mejorar el aprovechamiento de nutrientes (Romagnoli, Denoia, Osso y Estancich, 2017; Spagnoletti, Fernández, Tobar y Chiocchio, 2013).

7.1.9 Materia seca radicular.

Se observó un efecto positivo a la inoculación en los dos últimos periodos de evaluación ($P < 0.01$). A los 90 días de evaluación, los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 presentaron los mayores valores con 26,57, 26,56, 27,45, 26,24 y 27, 65% respectivamente. El tratamiento T1 doble inoculación superó al tratamiento T6 en 20% y al tratamiento T7 en 3,9%.

A los 120 días el T1, superó en un 72 % al tratamiento con fertilización química, demostrando la utilidad de la asociación de micorrizas y *Bradyrhizobium* en las plantas para aumentar el producto de las raíces en cantidad de biomasa (Juge, Prévost, Bertrand, Bipfubusa, & Chalifour, 2012).

Estos resultados nos indican como la inoculación con HMA puede causar cambios fisiológicos y bioquímicos a través de la simbiosis la cual modifica la morfología de la raíz, posiblemente relacionado con la capacidad del hongo para producir hormonas, que inducen y aceleran, la elongación de los tejidos (Fernández, 2003), además los rhizobium promueven el desarrollo de los pelos radicales mediante la producción de fitohormonas, como el ácido indol acético, ácido giberélico y citoquinas, regulando el crecimiento y modificando así la morfología y aumento de la biomasa radical, (Santillana, Arellano y Zúñiga, 2005) Citando a (Chabot et al; 1996 ; Perrine et al; 2004; Yanni et al; 2001).

Los resultados positivos de la coinoculación del *Bradyrhizobium* con endomicorrizas como *Glomus fasciculatum*, *Scutellospora heterogama*, *Glomus mosseae*, *Glomus manihotis*, *Acaulospora rugosa* y *Entrophospora* colombiana, generan respuestas positivas en la producción de las plantas de *P. guachapele* en la fase de vivero; se evidencia que estas especies fueron capaces de modificar la arquitectura del sistema radical a través del desarrollo de las hifas en el suelo.

La aplicación de inóculos de HMA en leguminosas ha registrado además del incremento de nutrientes en la planta, mayores respuestas en el desarrollo radicular, reflejados en la red de hifas y las raicillas micorrizadas. La combinación de las micorrizas con el *Rhizobium* puede favorecer aún más el efecto de los hongos micorrizógenos al establecer mecanismos de sinergia a nivel biológico que repercuten en las plantas hospedadas (Talbot & Treseder, 2010).

De esta forma, transfieren hacia la leguminosa elementos minerales, agua y otras sustancias importantes para el crecimiento vegetativo (Ortiz, Osorio, Echeverri, González y Medina, 2015). En otras investigaciones se evidencia que las hifas de las micorrizas producen glomalina, que es una glicoproteína insoluble en agua que actúan como aglutinantes de minerales y materia orgánica; las cuales están relacionada con mejorar y estabilizar los agregados de la estructura del suelo (Grumberg et al; 2013). La sinergia que se presentan entre los microorganismos y las plantas inoculadas favorece la absorción de nutrientes esenciales (Ojeda, Herrera, Furrázola, y Hernández, 2014).

7.2. Variables microbiológicas.

En la Tabla 4 se muestra la comparación de medias según la prueba de Tukey, de las variables microbiológicas asociadas a la coinoculación de plantas de *Pseudosamanea guachapele*, como efecto a los tratamientos evaluados.

Tabla 4. Respuesta a la inoculación y fertilización sobre variables microbiológicas

Tratamiento	Nódulos			Micorrizas		
	Número (No)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Número esporas (No)	Colonización (%)	
	Días					
	90	120	120	120	120	
Significancia	**	**	**	**	**	**
T1	23,67 ^a	42,22 ^{ab}	4,83 ^a	0,21 ^a	86,8 ^c	40,8 ^d
T2	21,78 ^a	53,22 ^{ab}	4,94 ^a	0,14 ^{ab}	87,4 ^c	75,3 ^c
T3	24,67 ^a	62,33 ^a	5,07 ^a	0,19 ^{ab}	310,9 ^b	87,3 ^a
T4	23,33 ^a	54,22 ^{ab}	5,07 ^a	0,16 ^{ab}	93,7 ^c	83,7 ^{ab}
T5	20,78 ^a	53,11 ^{ab}	4,96 ^a	0,11 ^{bc}	532,0 ^a	23,0 ^e
T6	0	0	0 ^b	0	135,2 ^c	1,4 ^f
T7	17,78 ^a	34 ^b	4,88 ^a	0,05 ^c	516,7 ^a	78,4 ^{bc}

(T1): Micorrizas 50 g + *Bradyrhizobium* (T2): Micorrizas 50 g (T3): Micorrizas 100 g + *Bradyrhizobium* (T4): Micorrizas 100 g (T5): *Bradyrhizobium* (T6): Fertilización con N y P (DAP); (T7): Testigo sin inocular.

** Diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), * Diferencias significativas ($P < 0.05$), ns no existen diferencias. Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

Los tratamientos con coinoculación mostraron un número superior de nódulos comparado con el tratamiento testigo; demostrando la efectividad de los biofertilizantes en simbiosis de *Bradyrhizobium* y micorrizas, así como de forma individual para incrementar el número de nódulos y mejorar sus características morfológicas (Abd-Alla, El-Enany, Nafady, Khalaf, & Morsy, 2014); (Leij, 2002).

Cabe resaltar que el tratamiento control T7 presentó nodulación, efecto asociado a la dependencia de la especie por generar asociación simbiótica con poblaciones nativas de rizobios; este experimento demostró como la especie *P. guachapele* crece y se desarrolla en condiciones de vivero en suelos no esterilizados con buenas respuestas agronómicas y asociaciones simbióticas con rizobios y hongos nativos, sin embargo la respuestas de producción de las plantas se puede mejorar con el uso de *Bradyrhizobium* inoculados mejorados de la especie y con hongos micorrízicos seleccionados (Patreze & Cordeiro, 2005; Lodeiro, 2015).

Efecto contrario observado en el tratamiento T6 donde podemos mencionar que el nivel de fertilización puede inhibir o disminuir la formación de nódulos (Pérez et al; 1996). Entre los factores que afectan el crecimiento de las leguminosas y que influyen negativamente en la nodulación y fijación del nitrógeno es la presencia de nitrógeno en suelo, el efecto que ejerce el exceso de nitrógeno en el proceso simbiótico se relaciona con la disminución de las poblaciones de rizobios, con la interferencia del fenómeno del reconocimiento hospedero-bacteria precursor del proceso de infección o porque los carbohidratos disponibles en el suelo, se emplean en la asimilación de nitrógeno y no en la formación de nódulos (Sylvia, Fuhrmann, Hartel, & Zuberer, 2004).

El peso fresco de los nódulos osciló entre 5,07 a 4,88 g. Todos los tratamientos inoculados fueron similares. El peso seco de los nódulos presentó diferencias altamente significativas a los 120 días de evaluación, el tratamiento T1, presentó el mayor peso con 0,21 superando al tratamiento sin inocular en un 320%.

La respuesta positiva a la nodulación y la respuesta en la germinación y desarrollo de las plantas de *P. guachapele*, posiblemente está asociada a la mayor producción de pectinas por las cepas de *Bradyrhizobium*, las cuales incrementan la permeabilidad de la pared celular de la raíz aumentando la penetración del simbionte (Costales, Nápoles y Falcón, 2007).

De igual manera, la producción del ácido-3-acético (AIA), el cual está asociado a la estimulación en el desarrollo del primordio del nódulo participa como regulador y control de la nodulación y la nitrogenasa (Woodward & Bartel, 2005; Gray & Smith, 2005) mencionan que los microorganismos son considerados la fuente primaria de sustancias biológicamente activas en el suelo y en microorganismos fijadores de nitrógeno, estimulan la producción de etileno, la respuesta a la nodulación y fijación de nitrógeno.

Adicionalmente, (Baker, Hill, & Parsons, 1997) sugieren que la concentración de compuestos nitrogenados reducidos a nivel foliar, presentan un proceso de retroalimentación con el estatus de nitrógeno en la planta, lo cual está estrechamente relacionado con la estimulación de la nodulación, retornando estos compuestos nitrogenados en aminoácidos a los nódulos para regular su crecimiento y actividad.

Dado que estos microorganismos simbioses son de gran importancia para la captación de nutrientes por parte de las plantas, al contribuir al ciclo del nitrógeno y del fósforo en el suelo, es interesante poder reconocer que algunos rizobios pueden verse beneficiados con la asociación de hongos HMA, donde las hifas pueden servir de nicho, como lo menciona (Artursson, Finlay, & Jansson, 2006; Sarabia, Madrigal y Carreón, 2013) “algunos *Rhizobium* y *Pseudomonas* adheridas a las esporas e hifas de hongos germinados”, posiblemente logran mejorar la nodulación gracias al contacto cercano a la raíz, además de mejorar colonización de hongos, beneficiando posiblemente al facilitar las interacciones metabólicas e intercambio de nutrientes.

Uno de los principales efectos de la biofertilización, se relaciona a la posibilidad de incrementar el área superficial subterránea combinada (raíces, raicillas y micorrizas) al mejorar absorción y conducción de sustancias agua y minerales (savia bruta) del suelo, a través de los pelos absorbentes, por intermedio del xilema y floema, además de almacenamiento de sustancias en el parénquima, lo que se favorece aún más en las leguminosas, al tener raíces y pelos radicales cortos. En varias leguminosas esta relación es también relacionada con el número de nódulos, que incide directamente en el nivel de proteína cruda de la especie forrajera (Morales, 2008).

7.2.2 Evaluación Micorrízica:

7.2.2.1. Numero de esporas.

El número de esporas presentes en el suelo presentó diferencias altamente significativas entre los tratamientos, el mayor número de esporas en el suelo se obtuvo en los tratamientos T5 y T7 con 532 y 516 esporas/g/suelo/seco. Donde se observó como la interacción de rizobios inoculados no afectó la propagación y número de esporas nativas en la rizósfera del tratamiento T5, sin embargo, se notó una baja susceptibilidad de la planta a la colonización de los hongos la cual presentó un 23% (Tabla 4), suponiendo como a menudo el número de esporas no indican infectividad, además de pensar en especificidad de la simbiosis (Requena, 1996).

Aunque se evidenció la presencia de esporas de micorrizas nativas en el suelo del tratamiento con fertilización química T6 (123 esporas/g/suelo seco), la colonización de las raíces en este periodo fue la más baja 1,49% (Tabla 4).

Este efecto se puede asociar a la presencia de nutrientes generados por la fertilización química, por lo que, la respuesta de la planta hospedante pudo variar dependiendo de la capacidad que presentaron los hongos nativos para producir hormonas como el ácido abscísico, giberelinas, auxinas y citocininas (Woodward & Bartel, 2005) o porque no se presentó dependencia al endófito por parte de la planta. Aunque si bien en diferentes estudios, (Noda, Martin, Pentón y Matos, 2013; Salto, Sagadin, Luna, Oberschelp y Harrand, 2015) se ha evidenciado que las micorrizas pueden ser estimuladas por la fertilización, en este ensayo, se evidenció que en *P. guachapele* la presencia y disponibilidad de nutrientes en el suelo, pueden ser definitivos para que el hospedero permita la colonización de este microsimbionte.

Además, de conocer por otros autores que altos niveles de N y P afectan negativamente la funcionalidad de la micorriza y se puede mencionar que está sujeta a varios factores como: clase de fertilizantes, características del suelo, cultivo, tipo de hongos MA, etc. (Blanco y Salas, 1997; Molina, Mahecha y Medina, 2005; Guerra, 2008).

En esta investigación se pudo observar, que la fertilización química no inhibió la germinación de esporas, sin embargo, la capacidad de las micorrizas para establecer simbiosis con la planta fue

baja, asumiendo que la disponibilidad de fósforo para la planta impidió la asociación de los hongos micorrízicos nativos (Sánchez de Prager et al; 2007; Ballesteros, Unigarro, Cadena y Cadena, 2004).

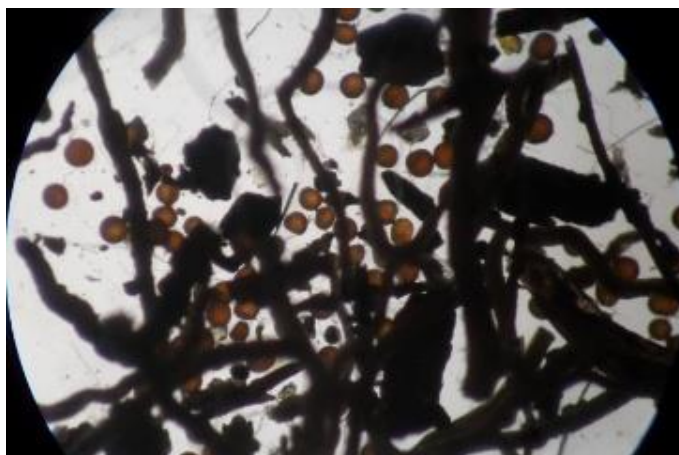


Figura 19. Evaluación variable conteo de esporas muestreo al cuarto mes.

Fuente: El autor.

7.2.2.2 Colonización.

La respuesta en el porcentaje de colonización mostro diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados, todos los tratamientos inoculados presentaron colonización por hifas de las micorrizas tanto por las introducidas como de las nativas. Los porcentajes de colonización oscilaron entre 1,4% y 87,39%. Como se observa en la tabla 4, la mayor colonización se observó en los tratamientos T3 y T4, con valores de 87,39 y 83,77%.

Teniendo en cuenta que la colonización de las raíces es el primer paso de la interacción entre plantas y microorganismos, se genera una relación íntimamente relacionada con el sistema radicular llegando a cubrir parcialmente la superficie (Sylvia, Fuhrmann, Hartel, & Zuberer, 2004), motivo por el cual, el uso de las variables microbiológicas puede dar indicadores más completos sobre el proceso de nodulación y la relación que pueda tener la formación del nódulo y la colonización de la raíz y la respuesta en planta. Donde se cree que los *Bradyrhizobium* benefician el establecimiento de las micorrizas al estimular el crecimiento micelial de los hongos como lo expresa (Barea, Azcón y Azcón Aguilar, 2002).

Estudios como el de (Sarabia, Madrigal y Carreón, 2013) mencionan como las rizobacterias estimulan el crecimiento de las micorrizas posiblemente por la estimulación al desarrollo radicular y una mayor sensibilidad de la raíz y reconocimiento a ser colonizada por los hongos.

Es importante mencionar como el tratamiento T6 se presentó un 1,4% de colonización donde se puede afirmar que la efectividad de las micorrizas puede verse reducida por altas dosis de fertilizantes fosfatados y nitrogenados, los cuales no permitieron que los hongos nativos logaran infectar y ser efectivos en un alto porcentaje las plantas (Montaño, Quiroz y Cruz, 2001).

Caso contrario al observado en el tratamiento testigo T7 el cual presentó una respuesta efectiva de cepas y porcentaje de colonización de hongos nativos, demostrando así simbiosis con las plantas de *P guachapele* (Ballesteros, Unigarro, Cadena, y Cadena, 2004).

El impacto positivo de las interacciones sinérgicas entre la Micorrizas y *Bradyrhizobium* en el *P. guachapele* en la medida de los aumentos en indicadores agronómicos y microbiológicos, están asociados con el incremento en el suministro de N fijado por el *Bradyrhizobium*, y este posiblemente dependió del nivel de suministro de fósforo de la micorriza. Azcón, Rubio y Barea (1991) afirman que las cepas de *Rhizobium* permiten un mejor crecimiento en las plantas, cuando se inoculan con diferentes hongos micorrízicos VA, los cuales mejoran la fijación de nitrógeno por parte del *rhizobium*, además esta respuesta está asociado a que los hongos aumentan las concentraciones de fósforo en el suelo.

De ahí que, el incremento del suministro de fósforo como consecuencia directa de la colonización de HMA o como consecuencia indirecta de la infección por *Bradyrhizobium* tuvo efectos positivos sobre la acumulación de biomasa foliar y radicular. Por lo anterior, el aumento de la acumulación de fósforo tuvo una influencia positiva en la eficiencia del uso de N fotosintético y que los límites superiores de la productividad del nitrógeno o la eficiencia del uso de N fotosintético pueden depender del nivel de suministro de fósforo (Xavier & Germida, 2003; Jia, Gray, & Straker, 2004).

8. Conclusiones y Recomendaciones

8.1 Conclusiones

8.1.1. Los resultados indican, que acorde a las características culturales, tintoriales y fisiológicas de las colonias y en el desarrollo de los nódulos *Pseudosamanea guachapele* se asocia con cepas del género *Bradyrhizobium sp.*

8.1.2. El efecto positivo de la inoculación de micorrizas y *Bradyrhizobium* en *Pseudosamanea guachapele*, se vio evidenciado en las respuestas de: crecimiento basal con incrementos del 58, 96%, peso seco basal con 207% y materia seca basal del 39%, con respecto al tratamiento con fertilización química.

8.1.3. Se evidencio con la inoculación una respuesta positiva en las variables radicales de *Pseudosamanea guachapele*, con incrementos del 337 y 530% en las variables de peso verde y seco radicular respectivamente, comparadas con el tratamiento con fertilización química.

8.1.4. En el análisis de las variables microbiológicas, se hallaron incrementos en un 59 y 320% en el número y peso seco de los nódulos, comparado con el tratamiento testigo e inoculado. De igual manera, el porcentaje de colonización y numero de nódulos, presentaron incrementos del 61 y 59% respecto al tratamiento con fertilización química.

8.1.5. La mejor interacción de los microsimbiontes con la leguminosa arbórea *Pseudosamanea guachapele* reflejada en las variables agronómicas y microbiológicas evaluadas bajo las condiciones del experimento, fue la coinoculación del inoculo mixto de cepa nativa de *Bradyrhizobium* y 50 g de micorrizas.

8.2 Recomendaciones

8.2.1. Es importante fomentar el uso de biofertilizantes de micorrizas, en cantidad de 50 gramos e inoculante con *Bradyrhizobium* de la especie arbórea *Pseudosamanea guachapele* en el momento de la siembra y en el establecimiento de la especie en los sistemas silvopastoriles.

8.2.2. Evaluar el efecto del biofertilizante mixto Micorrizas y *Bradyrhizobium*, en la composición química nutricional del follaje de *Pseudosamanea guachapele* mediante el fraccionamiento de la proteína, según el *Cornell Net Carbohydrate and Protein System* (CNCPS), la digestibilidad de la materia seca, y la concentración de minerales con énfasis en calcio y fósforo.

8.2.3. Se sugiere, evaluar la inclusión de la especie leguminosa nativa *Pseudosamanea guachapele* en diferentes arreglos silvopastoriles multiestratos y multiespecies en el Bosque seco Tropical (Bs-T), utilizando en su establecimiento los biofertilizantes y dosis evaluadas en este experimento.

8.2.4. Realizar alianzas estratégicas con la comunidad científica y el sector productivo, y darle así continuidad a esta investigación con la especie nativa *Pseudosamanea guachapele*. Fortaleciendo el uso y preservación de especies leguminosas arbóreas nativas en sistemas silvopastoriles del Bosque seco Tropical.

Bibliografía

1. Abd-Alla, M. H; El-Enany, A.W; Nafady, N. A; Khalaf, D. M; y Morsy, F. M. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*, 169(1), 49-58. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.007>
2. Aguirre , J.F; Moroyoqui, D.M; Mendoza, A; Cadeña , J; Avendaño, C.H; y Aguirre, J.F. (2011). Hongo endomicorrízico y bacteria fijadora de nitrógeno inoculadas a *Coffea arábica* en vivero. *Agronomía mesoamericana*, 22(1), 71-80. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/437/43721202009.pdf>
3. Ahmed, S.R; Thakore, B.B.L. (2003). Compatibility of VAM Fungus (*Glomus Fasciculatum*) with *Rhizobium Leguminosarum* and PSB and their effect on Plant Growth Attributes of Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). *Maharana Pratap University of Agriculture and Technology, Udaipur/Thesis*. Recuperado de: <http://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/5810006855>
4. Alarcón, A; Ferrera, R. (1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamérica*, 17(3), 179-191. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/573/57317302.pdf>
5. Alcaldía de Medellín. (2011). ÁRBOLES NATIVOS Y CIUDAD Aportes a la silvicultura urbana de Medellín. *Medellín: Secretaría del Medio Ambiente de medellín*, 94-95. Fondo editorial Jardín Botánico de Medellín. Recuperado de: <https://www.medellin.gov.co/irj/go/km/docs/wpccontent/Sites/Subportal%20del%20Ciudadano/Medio%20Ambiente/Secciones/Publicaciones/Documentos/2012/Arboles%20Nativos%20y%20Ciudad%20-%20Libro.pdf>
6. Alzugaray, P; Haase, D; y Rose, R. (2004). Efecto del volumen radicular y la tasa de fertilización sobre el comportamiento en terreno de plantas de pino Oregón (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) producidas con el método 1+1. *Bosque* (Valdivia), 25 (2), 17-33. Recuperado de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-92002004000200003&script=sci_arttext&tlng=en
7. Aristizabal, F. A; Cerón, L. E. (2012). Dinamica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4194085>
8. Arnold, F.E. (1996). Manual de vivero forestal: Elaborado para algunas especies forestales nativas de la zona templada del Sur de Chile. Documento Técnico CONAF-DED. 123p. Recuperado de: <http://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/123456789/26345>

9. Artursson, V; Finlay, R. D; y Jansson, J. K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental microbiology*, 8(1), 1-10. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x>
10. Asimi, S; Gianinazzi, P; y Gianinazzi, S. (1980). Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and Rhizobium in soybeans. *Canadian journal of Botany*, 58(20), 2200-2205. Recuperado de: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/b80-253#.XWV7tOhKjIU>
11. Azcón, C; Barea, J.M. (1980). Mycorrhiza. *Ciencia e Investigacion*, 8-16.
12. Azcón, R; Rubio, R; y Barea, J.M. (1991). Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and Rhizobium meliloti strains, and their effects on growth, N₂-fixation (15N) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytologist*, 117(3), 399-404. Recuperado de: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00003.x>
13. Baker, A; Hill, G. F; y Parsons, R. (1997). Evidence for N feedback regulation of N₂ fixation in *Alnus glutinosa* L. *Journal of Experimental Botany*, 48(1), 67-73. Recuperado de: <https://doi.org/10.1093/jxb/48.1.67>
14. Ballesteros, W; Unigarro, A; Cadena, C; y Cadena, J. (2004). Evaluacion de hongos formadores de micorrizas vesiculo arbusculares (mva) en la etapa de almacigo de cacao (*Theobroma cacao* L.), en tumaco, Nariño. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 21(1-2). Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6191595>
15. Barea, J. M; Azcón, R; y Azcón, C. (2002). Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 343-351. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020588701325>
16. Barker, S.J; Tagu, D. (2000). The roles of auxinas and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation*.19(2),144-154. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s003440000021>
17. Bashan, Y; de-Bashan, L. E. (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*. 108,(77-136). Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
18. Blanco, F. A; Salas, E. A. (1997). Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigacion realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 21(1), 55-67. Recuperado de: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v21n01_055.pdf
19. Boraste, A; Vamsi, K.K; Jhadav, A; Khairnar, Y; Gupta, N; Trivedi, S;Patil, P; Gupta, G; Gupta, M; Mujapara, A.K y Joshi, B. (2009). Biofertilizers: A novel tool for agriculture. *International Journal of Microbiology Research*, 1(2), 23-31. Recuperado de: https://bioinfopublication.org/files/articles/1_2_6_IJMR.pdf

20. Cárdenas, P. A; Ángel, S; y Pérez, C. (2011). Evaluación nutricional del Iguá (*Pithecellobium guachapele*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarías*, 24, 519. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v24n3/v24n3a32.pdf>
21. Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola. Vida y muerte de los microorganismos. Recuperado de: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/aura/vida_y_muerte_microbiana
22. Catford, J. G; Staehelin, C; Lerat, S; Piché, Y; y Vierheilig, H. (2003). Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. *Journal of Experimental Botany*, 54(386), 1481-1487. Recuperado de: <https://doi.org/10.1093/jxb/erg156>
23. CATIE. (sin fecha). Leguminosae Mimosoideae Pseudosamanea guachapele (Kunth) Harms. Recuperado de: http://www.arbolesdecentroamerica.info/index.php/es/species/item/download/208_2b92c550d0e30f415ea21f3624e621
24. Cerón, L.E; Aristizábal, F.A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4194085>
25. Chabot R; Antoun H; Kloepper J.W. y Beauchamp C.J. (1996). Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8), 2767-2772. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8702269>
26. Chamorro, D.R. (1998). Sistemas de evaluación de especies forrajeras: conceptos y procedimientos técnicos. *Agrosavia Corporación colombiana de investigación agropecuaria*, 21-32. Recuperado de: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/16283>
27. Chamorro, D.R. (2002). Importancia de la proteína en la nutrición de rumiantes con énfasis en la utilización de proteínas de especies arbóreas. *Memorias del Seminario-Taller Internacional sobre Manejo de La Proteína en Producción de Ganado Bovino*, 16. Bogotá: Corpoica.
28. Chamorro,D; Rey, A. M; Useche, J; Novoa, B; Cespedes, L; Peralta, L; Carpintero,D; Palomino, J; Barriga, J; Galindo, D; González, D y Ramírez, R. (2007). Manual de especies leñosas para sistemas agroforestales y silvopastoriles en la provincia del Sumapaz. *Universidad de Cundinamarca, Cundinamarca (Colombia) Centro Agropecuario La Angostura, Campoalegre-Huila (Colombia) Universidad Nacional Abierta ya Distancia, Bogotá (Colombia)*. Recuperado de: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=083876>
29. Chamorro,D.R; Rey, A.M. (2008). El componente arbóreo como dinamizador del sistema de producción de leche en el tropico alto colombiano : experiencias de Corpoica - Tibaitatá. *Calí (Colombia): Fundacion CIPAV*. Recuperado de: <https://agropecuaria->

primotc.hosted.exlibrisgroup.com/primo-explore/fulldisplay?docid=57BAC_Aleph000056725&context=L&vid=BAC&lang=es_CL&search_scope=bac_completo&adaptor=Local%20Search%20Engine&tab=bac_tab&query=any,contains,EI%20componente%20arb%C3%B3reo

30. Chamorro, D; Rey, A. M. (2010). Los sistemas silvopastoriles como estrategia de ganadería ecológica y productiva. Colombia. Recuperado de: <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/los-sistemas-silvopastoriles-como-t28359.htm>

31. Chamorro, D. R. (2012). Memorias Encuentro Zonal de Investigación y Desarrollo Empresarial. Memorias, (2). Reingeniería de la ganadería bovina con sistemas silvopastoriles como estrategia para mitigar el cambio climático, conservación in situ y certificación ecológica. 92-100. Colombia. Recuperado de: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/memorias/article/view/1791/2077>

32. CIAT. (1985). Aislamiento, caracterización y evaluación de Rizobios para leguminosas forrajeras en: suelos ácidos de América tropical. Cali, Colombia. Recuperado de: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/Digital/SB208.A4B6C.1_Aislamiento,_caracterizaci%C3%B3n_y_evaluaci%C3%B3n_de_rizobios_para_leguminosas_forrajeras.pdf

33. CIAT. (1987). Simbiosis Leguminosa-Rizobio: Evaluación, selección y manejo. Recuperado de: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/Digital/AV_SB_317_.L43_S5_GUIA_Simbiosis_leguminosa-rizobio_Evaluaci%C3%B3n,_selecci%C3%B3n_y_manejo.pdf

34. Colón, J; Gutiérrez, M; M, R; y Probanza, A. (1999). Incremento de parámetros biométricos y de la actividad biológica rizosférica de *Pinus pinea* mediante la utilización de bacterias promotoras del crecimiento y ectomicorrizas. *Universidad San Pablo CEU. Fac CC. Experimentales y técnicas.*

35. Constantino, M; Gómez, R; Álvarez, J.D; Pat, J; y Espín, G. (2010). Efecto de la biofertilización y los biorreguladores en la germinación y el crecimiento de *carica papaya L.* *Revista Colombiana de Biotecnología.* 12(2): 103-115. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3410768>

36. Constantino, M; Gómez, R; Álvarez, J. D; Pat, J. M; y Espín, E. G. (2011). Efecto de la inoculación de *Azotobacter chroococcum* y *Glomus intraradices* en el crecimiento y nutrición de plántulas de papaya en fase de vivero. *Agronomía Costarricense*, 35(1), 15-31. Recuperado de: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/ac/v35n1/a02v35n1.pdf>

37. CORANTIOQUIA. (2005). Guía para el manejo de las semillas y la propagación de diez especies forestales del bosque seco tropical. Medellín. Recuperado de: http://www.corantioquia.gov.co/ciadoc/FLORA/AIRNR_CN_5551_2004_2.pdf

38. Corrales, L. C; Arévalo, Z. Y; y Moreno, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *12(21)*, 67-79. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n21/v12n21a06.pdf>
39. Costales, D; Nápoles, M. C; y Falcón, A. (2007). Influencia de oligosacáridos de quitosana y pectina en la interacción simbiótica soya-Bradyrhizobiu. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, *41(2)*, 175-181. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017658014>
40. Coyne, M; Rasskin, M. (2000). Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. 416. Recuperado de: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=LIBROS.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=008668>
41. crush, j.r. (1974). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza vii. growth and modulation of some herbage legumes. *New Phytologist Trust*, *73(4)*, 743-749. Recuperado de: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-8137.1974.tb01302.x>
42. DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadistas. (2014). *Producto Interno Bruto-Colombia. Cuarto trimestre y total anual de 2013*. Recuperado de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/pib/presen_PIB_IVtrim13.pdf
43. DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadistas. (2016). Tercer Censo Nacional Agropecuario. Recuperado de: <https://www.dane.gov.co/files/images/foros/foro-de-entrega-de-resultados-y-cierre-3-censo-nacional-agropecuario/CNATomo2-Resultados.pdf>
44. de Carvalho Balieiro, F; Franco, A. A; Pereira, M. G; Carneiro, E. F; Dias, L. E; de Faria, S. M; y Rodriguez, B. J. (2004). Dinâmica da serapilheira e transferência de nitrogênio ao solo, em plantios de *Pseudosamanea guachapele* e *Eucalyptus grandis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *39(6)*, 597-601. Recuperado de: <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/6813>
45. Dodd, J.C; Rosendahl, S; Giovannetti, M; Broome, A; Lafranco, L; y Walker, C. (1996). Inter- and intraspecific variation within the morphologically-similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. *New phytologist trust*, *133(1)*, 113-132. Recuperado de: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04347.x>
46. Douglass, J. (2001). Influence of root architectural development on Douglas- fir seedling morphology and physiology. (Tesis de Doctorado). Oregon State University. Recuperado de: https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/2514np72q
47. Espinoza, S. R. (2014). Caracterización morfológica de esporas de micorrizas del Género *Glomus* sp. a nivel de invernadero y de campo en el cultivo de soya *Glycine max* L. (Tesis de pregrado). Universidad de Guayaquil. Recuperado de: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/3936>

48. Ferrara, R; y Alarcón, A.(2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia ergo-sum*, 8(2). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/104/10402108.pdf>
49. Fitze, D; Wiepning, A; Kaldorf, M; Ludwigmüller, J. (2005). Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. *J Plant Physiol.* 162.1210-1219.
50. Fonseca, D. (2007). Evaluación agronómica de nuevas variedades Pennisetum purpureum en condiciones de sequía el Valle del Cauca, "INDIO. (Tesis de Maestría). Recuperado de: <https://biblioteca.ihatuey.cu/link/tesis/tesism/dalibiadiaz.pdf>
51. Gallego, J; Morales, S; y Vivas, N. (2011). Especies arbóreas y arbustivas forrajeras en sistemas de producción ganadera del trópico bajo del departamento del Cauca. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*,4(1). Recuperado de: <http://revistas.ut.edu.co/index.php/ciencianimal/article/download/142/141>
52. Gardezi, A.K; Márquez, S.R; y Ayala, A.V. (2015). Los usos y beneficios de las micorrizas en la agricultura. *Desarrollo y tecnología.* Aportes a los problemas de la sociedad. México: Plaza y Valds Editores, 243-265. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Elizabeth_Acosta2/publication/280114658_Sistema_Agroforestal_establecido_en_suelos_del_Distrito_de_Riego_028_Tulancingo_Hidalgo/links/55aaf4e208ae815a04279460/Sistema-Agroforestal-establecido-en-suelos-del-Distrito-de-Riego-028-Tulancingo-Hidalgo.pdf#page=244
53. Gerdemann, J.W; Nicolson, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological society*, 46(2), 235-244. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
54. González, R. L; Núñez, D.B; y Barceló, R. (2012). Efecto de la aplicación de Rhizobium y Micorriza en el crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) variedad CC-25-9 negro. *Centro Agrícola*, 39(4), 17-20. Recuperado de: http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V39-Numero_4/cag044121877.pdf
55. Gray, E.J; Smith, D.L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>
56. Grumberg, B; Conforto, E. C; Vargas, S; March, G; Luna, C; Rovea, A; Boxler, M; y Meriles, J. (2013). La glomalina y su relación con la productividad del cultivo de maíz. Recuperado de: <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/glomalina-relacion-productividad-cultivo-t30398.htm>
57. Guadarrama, P; Sánchez, I. (2004). Hongos y plantas beneficios a diferentes escalas a micorrizas arbusculares. *Ciencias*, (73). Recuperado de: <http://revistas.unam.mx/index.php/cns/article/download/11929/11251>

58. Guerra, B.E. (2008). Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Revista tecnológica en Marcha*, 21(1), Pág. 191-201. Recuperado de: https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1352
59. Guevara, O. (2002). Deforestación y medio ambiente en Colombia. *Economía Colombiana y coyuntura política*, 6, 290. Recuperado de: <https://www.contraloria.gov.co/resultados/publicaciones/revista-economia-colombiana>
60. Hernández, E. J. (2014). Efecto de *Rhizobium spp.* y *Boletus frostii* en el crecimiento de plantulas de *Quercus resinosa*. (Tesis de Pregrado). *Universidad Autonoma de San Luis Potosí. Facultad de Agronomía y Veterinaria*. Recuperado de: <http://148.224.97.92/jspui/bitstream/i/3376/1/IAE1EFE01401.pdf>
61. Hernández, M. (2011). Principales Especies Arbustivas Usadas En Sistemas Silvopastoriles De La Región Del Sumapaz. *Universidad cundinamarca, Fusagasugá, Col, 2*.
62. Hernández, S. G. (2014). Colombia, el segundo país mas caro para producir leche en America. *Contexto ganadero*. Recuperado de: <https://www.contextoganadero.com/>
63. Jaramillo, D.F. (2002). Introducción a la ciencia del suelo. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2242/1/70060838.2002.pdf>
64. ICA. (2018). Censo Pecuario Nacional. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018.aspx>
65. Iñon, N. (s.f.). Ciclo del nitrogeno. Fijacion Biologica del Nitrogeno. Recuperado de: <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2018/QuimicaBiol/1528215167.pdf>
66. Jia, Y; Gray, V. M; y Straker, C. J. (2004). The influence or *Rhizobium* and Arbuscular Mycorrhizal fungi on Nitrogen and Phosphorus Accumulation by *Vicia faba*. *Annals of Botany*, 94(2), 251-258. Recuperado de: <https://doi.org/10.1093/aob/mch135>
67. Jones, K. (1974). *Nitrogen Fixation in a Salt Marsh*. Recuperado de: <https://www.jstor.org/stable/2258998>
68. Juge, C; Prévost, D; Bertrand, A; Bipfubusa, M; y Chalifour, F.P. (2012). Growth and biochemical responses of sobean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. *Applied Soil Ecology*, 61, 147-157. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139312001345>
69. Koske, R; Gemma, J. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *ScienceDirect*, 92(486-488). Recuperado de: <http://bibliotecavirtual.unad.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true>

&db=edselec&AN=edselec.2-52.0-84879228334&lang=es&site=eds-live&scope=site>. Acceso em: 6 fev. 2019.

70. Lafaurie, J. F. (2008). Ganadería del Futuro: Responsabilidad Social y Ambiental. En. Murgueitio, Cuartas & Naranjo (Eds). *Ganadería del futuro: investigación para el desarrollo*, 13-17. Cali, Colombia: Fundacion CIPAV. Recuperado de: <http://www.cipav.org.co/pdf/noticias/PaginasSSPCIPAV.pdf>

71. Leij, D. A. (2002). Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. *Applied Microbiology*, 26(4), 311-316. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1472-765X.1998.00337.x>

72. Lodeiro, A. R. (2015). Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium spp.* *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 171-278. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.006>

73. López, C.C ; Espinoza, Y.Y; y Caballero, A.J. (2005). Efectos de la aplicación combinada y separada de micorriza vesículo arbusculares (MVA) y bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter*) sobre la fenología, productividad y susceptibilidad a patógenos en el cultivo de chiltoma (*Copsicum annum L*) variedad A. (Tesis de Pregrado).Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua, Leon. Recuperado de: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/905/1/197937.pdf>

74. Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1-20. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221548>

75. Mendez, F. (2010). *Efecto de una bacteria tipo Rhizobium en jitomate Saladette*. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/27581731/Efectos-de-Bacteria-Tipo-Rhizobium-en-Jitomate-Saladette>

76. Meng, L; Zhang, A; Wang, F; Han, X; Wang Dejiang; y Li. S. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi and *rhizobium facilitate* nitrogen uptake and transfer in soybean/maize intercropping system. *Frontiers in Plant Science*, 6, 639. Recuperado de: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00339>

77. Molina, M; Mahecha, L; y Medina, M. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de arboles en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2). Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v18n2/v18n2a07.pdf>

78. Montaña, N.M; Quiroz, V; y Cruz, G. (2001). Colonización micorrizica arbuscular y fertilización mineral de genotipos de maiz y trigo cultivados en un andisol. *Terra Latinoamericana*, 19(4), 337-344. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/html/573/57319406/>

79. Mora de Gonzalez, N. (1983). Fijación simbiótica de nitrógeno por plantas leguminosas: Aspectos biológicos. *Suelos Ecuatoriales*, 12 (2), 18-27.

80. Morales, A; Sarmiento, D. M. (2008). Árboles del Bosque Seco Tropical en el área del Parque Recreativo y Zoológico Piscilago-Nilo, Cundinamarca. Universidad Autónoma de Colombia. Recuperado de: https://www.ecosistemassecos.org/images/bibliografia/arboles_del_bosque.pdf
81. Moreno, F; Bustamante, C; Murgueitio, E; Arango, H; Calle, Z; Naranjo, J.F; Cuartas, C.A; y Caro, M.F. (sin fecha). Cartilla 3 Recurso natural flora. Recuperado de: <https://www.fedegan.org.co/cartilla-3-recurso-natural-flora>
82. Morón, A. (2000). Alfalfa: Fertilidad de suelos y estado nutricional en sistemas agropecuarios de Uruguay. *Informaciones Agronómicas del cono sur*, 8, 1-6. Recuperado de: <http://www.inia.org.uy/sitios/lesis/fertilizacion/IPNIAlfalfaUruguayMoron.pdf>
83. Mosse, B. (1981). Vesicular-arbuscular Mycorrhiza Research for Tropical Agriculture.
84. Múnevar, F. (1982). Principales procesos microbiológicos en el suelo y su función en la productividad agropecuaria. *Corporacion Colombiana de investigación Agropecuaria*, 12, 7-17. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/13921>
85. Murgueitio, E; Arango, H ; Calle, Z; Naranjo, J. F; Cuartas, C. A; y Caro, M. F. (2009). Medidas integrales para el manejo ambiental de la ganadería bovina. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/297706094_Medidas_integrales_para_el_manejo_ambiental_de_la_ganaderia_bovina_Cartilla_N_4_Sistemas_Alternativos_de_Produccion_Ganadera
86. Murgueitio, E; Calle, Z; Uribe, F; Calle, A; y Solorio, B. (2011). Native trees and shrubs for the productive rehabilitation of tropical cattle ranching lands. *Forest Ecology Management*, 261(10), 1654- 1663. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.09.027>
87. Murgueitio, E; Cuartas, C. A ; y Naranjo, J.F. (2008). Ganadería del Futuro: Investigación para el Desarrollo. CIPAV. Recuperado de: <http://www.cipav.org.co/noticias/noticias-n5.html>
88. Nadeem, S; Ahmad, M; Zahir, Z; Javaid, A; y Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2), 429-448. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005>
89. Navarra, H. d. (s.f.). Fijacion del nitrógeno atmosferico. Organismos fijadores de nitrógeno. Recuperado de: https://www.unavarra.es/herbario/leguminosas/htm/organismos_fijadores_L.htm
90. Noboa, M.E. (2016). Comparación del efecto del riego con aguas residuales provenientes de las lagunas de oxidación de santa Elena, sobre 4 especies forestales (*loxopterygium huasango*, *tabebuia sp*, *pseudosamanea guachapele*, *caesalpinia glabrata*) en

etapa de vivero. (Tesis de Pregrado). Escuela superior politécnica del litoral , guayaquil – ecuador. Recuperado de: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/31564>

91. Noda, Y. (2009). Las micorrizas: una alternativa de fertilización ecológica en los pastos. *Pastos y Forrajes*, 32(2). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03942009000200001&script=sci_arttext&tlng=pt

92. Noda, Y; Martin, G; Pentón, G; y Matos, W. (2013). Efecto de la fertilización química y biológica en el rendimiento morfoagronómico de *Morus alba*. *Pastos y forrajes*, 36(2), 190-196. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03942009000200001&script=sci_arttext&tlng=pt

93. Ojeda, L.J; Herrera, R; Furrázola, E; y Hernández, C. (2014). Efecto de inoculaciones conjuntas de *Rhizobium*-Micorrizas Arbusculares en *Leucaena leucocephala* CV: Perú. *Centro Agrícola*, 41(3), 17-21. Recuperado de: http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V41-Numero_3/cag033141982.pdf

94. Ortiz, A; Osorio, N.W ; Echeverri, J; González, A.O ; y Medina, M. (2015). Fisiología de los hongos formadores de micorrizas arbusculares. *Livestock Research for Rural Development*, 27(9). Recuperado de: <http://www.lrrd.org/lrrd27/9/orti27188.html>

95. Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas.(Tesis de pregrado). Universidad Católica Argentina. Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/32621045.pdf>

96. Parkash, V; Aggarwal, A. (2009). Diversity of endomycorrhizal fungi and their synergistic effect on the growth of *Acacia catechu* Willd. *Journal of Forest Science*, 55(10), 461-468. Recuperado de: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/10707.pdf>

97. Patreze, C. M; Cordeiro, L. (2005). Nodulación, colonización de micorrizas arbusculares y crecimiento de algunas leguminosas nativas de Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 19(3). Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062005000300014>

98. Pedraza, R.O; Teixeira, K.R; Fernández, A ; García, I; Baca, B.E; Azcón, R; Vera, L.D y Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449945029007.pdf>

99. Pellegrini, A. E. (2017). Nitrogeno del suelo. Recuperado de: http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/35406/mod_resource/content/1/TEMA%2012%20-%20NITROGENO.pdf

100. Perea, V. M; Pérez, J; Villareal, L; Trinidad, A; de Bauer, M.L; Cetina, V; y Tijerina, L. (2009). Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 32(2), 93-102. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000200004

101. Perez C, A; De la Ossa, V.J; y Montes V, D. (2012). Hongos solubilizadores de fosfatos en fincas ganaderas del departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 4(1), 34-45. Recuperado de: <https://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/view/263/304>

102. Pérez, J. J; Clavero, T; Razz, R; Garcia, Z; González, L; y de Rincon, C. C. (1996). Efecto de la fertilización sobre la nodulación y crecimiento radicular en *Acacia mangium Willd* en condiciones de vivero. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia*, 13, 161-167. Recuperado de: https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=perez%2C+J+J+Efecto+de+la+fertilizaci%C3%B3n+sobre+la+nodulaci%C3%B3n+y+crecimiento+radicular+en+Acacia+mangium+Willd+en+condiciones+de+vivero&btnG=

103. Perrine, F.M; Rolfe, B.G; Hynes, M.F; y Hocart, C.H. (2004)9. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of *Rhizobium* exudates. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(9), 723-729. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942804001251>

104. Phaff, H. J. (1981). Microorganismos industriales. *Investigacion y Ciencia*, 62, 23-37.

105. Phillis, J.M; Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-161. Recuperado de: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19711101080>

106. Pimienta, E; Zañudo, J; y López, E. (2009). Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Acta botánica mexicana*, 89, 63-78. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-71512009000400005

107. Posada, J.O. (2005). Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros. Recuperado de: https://books.google.com.co/books?id=rbezH_RPHVYC&pg=PA185&lpg=PA185&dq=Aunque+en+algunos+casos+los+n%C3%B3dulos+se+forman+en+los+tallos+como+en+Sesbania+y+Aeschynomene&source=bl&ots=_8ha1JkM4k&sig=ACfU3U34I-eZTQIzR2JiJhhzFgiqXqwOfQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjF7a7n57TjAhXhQ98KHYUYBP4Q6AEwAHoECAkQAQ#v=onepage&q=Aunque%20en%20algunos%20casos%20los%20n%C3%B3dulos%20se%20forman%20en%20los%20tallos%20como%20en%20Sesbania%20y%20Aeschynomene&f=false

108. Prieto, D.J; Orjuela, E; y Cárdenas, L. (2005). Comparación de la eficiencia de los abonos orgánicos con respecto a los abonos químicos en fertilización en cultivo de toronjil (*Melissa officinalis*). *Tecnogestión*, 2(1). Recuperado de: <https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/tecges/article/view/4328>

109. Quilambo, O. A. (2003). The vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 539-546. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2003.000-1105>
110. Ramírez, M; Rodríguez, A. (2010). Señales de reconocimiento entre plantas y hongos formadores de micorrizas arbusculares. *Ciencia y tecnología agropecuaria*, 11(1), 53-60. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/306021473_Senales_de_reconocimiento_entre_plantas_y_hongos_formadores_de_micorrizas_arbusculares
111. Rojas, L. C; Artunduaga, L. G; Ángel, Y. K; y Suarez, J. C. (2015). Especies arbóreas de uso múltiple en zonas de bosque seco tropical en el sur de Colombia. *Momentos de ciencia*, 12(1). Recuperado de: <http://www.udla.edu.co/revistas/index.php/momentos-de-ciencia/article/view/489/481>
112. Requena, N. (1996). Exploración de la biodiversidad microbiana (hongos de la micorriza arbuscular-*Rhizobium*-Rizobacterias) en un ecosistema mediterráneo desertificado dirigida a una estrategia de revegetación.(Tesis de Pregrado). Universidad de Granada. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10481/35622>
113. Rey, A. M; Chamorro, D. R; y Ramírez, M. (2005). Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad del forraje de *Leucaena leucocephala*. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 6(2), 52-59. Recuperado de: <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/49/50>
114. Rey, A. M; Chamorro, D. R; Correa, M; y Rodríguez, H. (2011). Aislamiento, caracterización y evaluación de cepas de rizobios de leguminosas arbóreas forrajeras. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(3). Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902011000300032#1
115. Rey, A.M; Barahona, R; y Chamorro, D.R. (2014). Producción de dos cepas de *Frankia* sp. aisladas de *Alnus acuminata* H.B.K. por fermentación fed-batch. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 5(1), 81-92. Recuperado de: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/925/916>
116. Richardson, A. E; Barea, J. M.; McNeill, A. M. y Prigent, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*, 321(1),305-339. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-9895-2>
117. Rivera, D.M. (2012). Formulación de un prototipo de Biofertilizante con base en *Rhizobium* sp. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de: <http://bdigital.unal.edu.co/7026/1/01192544.2012.pdf>

118. Rivero, R; Giraldo, C.T; y Graham, P.H. (1976). Comparación de nodulación y fijación de nitrógeno por *Rhizobium* en frijol *Phaseolus vulgaris* L. y soja *Glycine max* (L) Merrill. *Acta Agronómica*, 26(3-4), 104-115. Recuperado de: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/download/48436/49645

119. Romagnoli, M.V; Denoia, J; Osso, M; y Estancich, E. (2017). Evaluación de la micorrización y parámetros de rendimiento en un cultivo de soja de segunda, fertilizado e inoculado. Recuperado de: http://rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/13085/Art03_Agromensajes48_agosto2017.pdf?sequence=2

120. Sadeghian, S.(2004). Efecto de la fertilización con nitrógeno fosforo, potasio y magnesio sobre las propiedades químicas de suelos cultivados en café. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Recuperado de: <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/273/1/arc054%2803%29242-257.pdf>

121. Saldarriaga, C. M. (2007). *Barbosa turistica*. Obtenido de *Barbosa turistica*. Recuperado de: https://barbosaturistica.es.tl/MAPA-BARBOSA_VEREDAS-Y-CORREGIMIENTOS.ht

122. Salto, C; Sagadin, M; Luna, C; Oberschelp, J; y Harrand, L. (2015). Efecto de la fertilización y de hongos micorrícicos arbusculares nativos en el crecimiento de plantines de algarrobo blanco. *Jordanas forestales de entre ríos*. Recuperado de: https://www.jornadasforestales.com.ar/jornadas/2015/Fertilizacion-y-HMA-en-algarrobo_Salto-et-al.pdf

123. Sánchez de Prager, M; Gómez, E. D; Muñoz, J. E; Barrios, E; Prager, M; y Marmolejo, F. (2007). Las endomicorrizas: Expresión bioedáfica de importancia en el tropico. Recuperado de: <http://bdigital.unal.edu.co/56779/1/2007-MarinaSanchezdePrager.pdf>

124. Sanjuán, J.M.(2001). Importancia de la biosíntesis bacteriana de leucina para el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, (Tesis Doctorado).Universidad de Granada. Recuperado de: <http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/2416/18200072.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

125. Santillana, N; Arellano, C; y Zúñiga, D. (2005). Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersion esculentum* Miller). *Ecología aplicada*, 4(1-2), 47-51. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/26446784_Capacidad_del_Rhizobium_de_promover_el_crecimiento_en_plantas_de_tomate_Lycopersicon_esculentum_Miller

126. Sarabia, M; Madrigal, R; y Carreón, Y. (2013). *Plantas, hongos micorrícicos y bacterias: su compleja red de interacciones*. *Biológicas*, 12(1), 65-71. Recuperado de: <http://files.luis-alberto-fosco.webnode.es/200000921->

305ec3159e/La%20importancia%20del%20uso%20de%20HAMPI%20en%20la%20multiplicacion%20microbiana%20.pdf

127. Smith, S. E; Read, D.J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. Recuperado de: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=qLciOJaG0C4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Mycorrhizal+Symbiosis&ots=zqWnTTBmJ&sig=n5mWtw16FSAgNCP2Jh3rTTxoJtQ#v=onepage&q=Mycorrhizal%20Symbiosis&f=false>

128. Souchie, E. L; Azcón, R; Barea, J. M; Saggin, J; y Ribeiro, E.M. (2006). Phosphate solubilizing and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41(9). Recuperado de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006000900009

129. Spagnoletti, F. N; Fernández, A; Tobar, N. E; y Chiocchio, V.M. (2013). Las micorrizas arbusculares y *Rhizobium*: una simbiosis dual de interés. *Revista argentina de microbiología*, 45(2), 131-132. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213029410012.pdf>

130. Stewart, J.L; y Dunsdon, A.J. (2000). The potential of some neotropical *Albizia* species and close relatives as fodder resources. *Agroforestry System*, 49(1), 17-30. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006326729201>

131. Sylvia, D.M; Fuhrmann, J. J; Hartel, P.G; y Zuberer, D. A. (2004). Principles and Applications of Soil Microbiology. Recuperado de: <https://www.amazon.es/Principles-Applications-Microbiology-David-Sylvia/dp/0130941174>

132. Tajini, F; Trabelsi, M; y Drevon, J. J. (2012). Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 157-163. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.11.003>

133. Toledo, J. M; Schultze, R. (1982). Metodología para la evaluación agronómica de pastos tropicales. *Red internacional de evaluación de pastos tropicales*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 91-110. Recuperado de: <https://hdl.handle.net/10568/82047>

134. Torreogroza, E; Salamanca, P; y Barea, J. M. (1992). Inoculación de leguminosas leñosas con micorrizas va y *rhizobium* orientada a la recuperación de suelos aridos. 4,(1). Recuperado de: <http://investigaciones.uniatlantico.edu.co/revistas/index.php/dugandia/article/view/709>

135. Van Der Heijden, M. G; Streitwolf, R; Riedl, R; Siegrist, S; Neudecker, A; Ineichen, K; Boller, T; Wiemken, A; y Sanders, I. R. (2006). The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172(4), 739-752. Recuperado de: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-8137.2006.01862.x>

136. Walch, P; Neumann, G; Bangerth, F; y Engels, C. (2000). Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 51(343),227–237. Recuperado de: <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.227>
137. Welbaum, G. E; Sturz, A. V; Dong, Z; y Nowa, J. (2010). Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(2), 175-193. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/07352680490433295>
138. Woodward, A; Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707-735. Recuperado de: <https://academic.oup.com/aob/article/95/5/707/201283>
139. Xavier, L. J; y Germida, J. J. (2003). Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* enhance pea yield and nutrition. *Biology and fertility of soils*, 37(5), 261-267. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-003-0605-6>
140. Yanni, Y.G; Rizk, R.Y; EL-Fattah, F.K; Squartini, A; Corich,V; Giacomini,A., ... y Vega, M. (2001). The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice root. *Funtional Plant Biology*, 28(9), 845-870. Recuperado de: <http://www.publish.csiro.au/fp/PP01069>
141. Zamorano, L.A. (2015).Efecto de la biofertilización en el crecimiento, rendimiento y calidad de frutos de *Capsicum annuum* cv. California Wonder, cultivados con y sin acolchado plástico en casa sombra y campo abierto. (Tesis maestría). Centro de investigación en química aplicada, Saltillo, Coahuila, México. Recuperado de: <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/259/1/Antonio%20Zamorano%20Moreneno.pdf>