

Crecimiento de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit inoculada con hongo micorrízico y bacteria fijadora de nitrógeno en vivero

In-nursery growth of Leucaena leucocephala (Lam.) De Wit inoculated with mycorrhizal fungus and nitrogen-fixing bacteria

JUAN FRANCISCO AGUIRRE-MEDINA¹, ALEJANDRO LEY-DE COSS^{1*},
MARÍA EUGENIA VELAZCO-ZEBADÚA² Y JUAN FRANCISCO AGUIRRE-CADENA³

¹Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas.
Entronque carretera costera y Estación Huehuetán. CP 30660. Fax (964)6270439. Huehuetan, Chiapas, México.

²Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Medicina -Veterinaria y Zootecnia.
Rancho San Francisco, Km 8.0 carretera Terán a Ejido Emiliano Zapata. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

³Colegio de Postgraduados Campus Puebla, Km.125.5 Carretera Federal México Puebla,

*Correo electrónico: aleycoss@gmail.com

RECIBIDO EL 18 DE MARZO DE 2015/ ACEPTADO EL 07 DE ABRIL DE 2015

RESUMEN

La alimentación de los bovinos en pastoreo se realiza en la mayoría de las explotaciones, a base de gramíneas. La producción de biomasa de estas plantas está influenciada por la distribución de la precipitación y cuando deja de llover, disminuye su crecimiento. Las leguminosas como *Leucaena leucocephala* pueden favorecer la producción de biomasa de calidad, aun en temporada de disminución de la precipitación, debido a que poseen un sistema radical pivotante y la facultad de asociarse a bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos endomicorrízicos. Con el objetivo de evaluar el efecto de inocular *Rhizophagus intraradices* solo o combinado con *Azospirillum brasilense* a *Leucaena leucocephala* en algunos componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento, se condujo el presente estudio en invernadero. Se utilizó un suelo Andosol-mólico y se preparó el sustrato agregando arena de río (1:1 v/v) y con la mezcla se llenaron bolsas de plástico con capacidad de cinco kg. Los tratamientos fueron: Testigo, *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense* y la combinación de ambos microorganismos distribuidos completamente al azar con cinco repeticiones. Se realizaron muestreos destructivos cada 15 días para medir variables morfológicas, fisiológicas, hasta los 105 días de edad. Se encontró que *A. brasilense* solo y en combinación con *R. intraradices* incrementó el peso seco de tallo y hojas a partir de los 15 días de la siembra, y en el sistema radical la mayor biomasa se indujo con *A. brasilense*. El AFE fue superior en los tratamientos inoculados con los microorganismos los primeros 30 días de la evaluación, y la TAN presenta incrementos iniciales en los tratamientos inoculados y con mayor desarrollo al final con *A. brasilense*.

Palabras clave: *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense*, componentes del rendimiento, forrajes.

INTRODUCCIÓN

Los árboles que fijan nitrógeno en simbiosis con rizobios, como *Leucaena*, y que además se asocian a otras bacterias y hongos que favorecen su crecimiento, son utilizados para mejorar la calidad de las pasturas para los bovinos en pastoreo en los trópicos. Esta interacción sucede en la rizosfera donde se realiza un amplio rango de actividades entre la planta huésped y los microorganismos (Kennedy, 2005)

ABSTRACT

Grass-based feeding of grazing cattle is done in most farms. Biomass production of grass is influenced by the distribution of precipitation, and when it stops raining, growth diminishes. Legumes such as *Leucaena leucocephala* can promote quality biomass production, even during the season of decreased precipitation, because they have a pivoting root system and the ability to associate with nitrogen-fixing bacteria and mycorrhizal fungus. In order to evaluate the effect of inoculating *Rhizophagus intraradices*, alone or combined with *Azospirillum brasilense*, into *Leucaena leucocephala* in some morphological and physiological yield components, the present study was conducted in a greenhouse. Andosol-mollic soil was used and a substrate was prepared by adding river sand (1:1 v/v); plastic bags with a capacity of five kilos were filled with the mixture. The treatments were: Control, *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense* and the combination of both microorganisms in a completely randomized design with five replications. Destructive sampling was done every 15 days to measure morphological and physiological yield components up to the 105 days of age. It was found that *A. brasilense* alone and in combination with *R. intraradices* increased the dry weight of stem and leaves after 15 days of sowing; and in the root system, the largest biomass was induced with *A. brasilense*. The AFE was higher in the treatments inoculated with microorganisms the first 30 days of evaluation, and TAN presents initial increases in inoculated treatments and higher development at the end with *A. brasilense*.

Keywords: *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense*, yield components, forage

mediante diferentes mecanismos de acción, como la fijación del nitrógeno o a través del transporte de nutrientes y agua a la planta.

Algunas bacterias como las de los géneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderias* y los hongos endomicorrízicos, favorecen el incremento en la calidad del forraje y se ha demostrado que inducen mayor crecimiento radical mediante la producción de sustancias reguladoras del crecimiento (Bashan & De Bashan,

2010); incluso, pueden proteger contra nemátodos (Dong & Zhang, 2006) e inhibir el crecimiento de diversos patógenos en la raíz (Harrier & Watson, 2004). Al inocularse pueden inducir acción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Sánchez et al., 2004; Diouf, Duponnois, Ba, Neyra & Lesueur, 2005; Lalitha, Rajeshwaran, Sentil Kumar & Deepa et al., 2011). Cuando se inocula más de un microorganismo en la semilla, se ha encontrado acción positiva en el desarrollo de algunas plantas, como la generada con *Rhizobium* y *Azospirillum*, que induce mayor desarrollo radical y del vástago en frijol (Aguirre-Medina, Kohashi-Shibata, Trejo-López, Acosta-Gallegos & Cadena-Iñiguez, 2005); así mismo, con *R. intraradices* y *Rhizobium* en *Leucaena* (Aguirre-Medina & Velasco, 1994). En las plantas que forman nódulos se mejora la nodulación y fijación de nitrógeno (Mishra, Sharma & Vasudevan, 2008) y con la mayoría de las plantas que establecen simbiosis con los hongos micorrízicos se favorece el transporte de nutrientes, como nitrógeno y fósforo (Aguirre-Medina, Aguirre-Cadena, Cadena-Iñiguez y Avendaño-Arrazate, 2012), la absorción de agua y se incrementa la tolerancia a la sequía (Augé, 2004). Una planta colonizada por los hongos micorrízicos puede ampliar la exploración del sustrato a través del micelio y transportar nutrientes a la raíz debido al incremento de la superficie de absorción del sistema radical de la planta (Sylvia, 2005).

Leucaena es un género con amplia diversidad biológica en México y con extensa distribución de ambientes (Zárate, 1994), es utilizada en diversos sistemas de producción y con múltiples propósitos (Wencomo & Lugo, 2013); además, es una de las leguminosas forrajeras con buenas características para la alimentación de los bovinos en pastoreo y otras especies animales, bien sea en bancos de proteína, o asociada a variados pastos. Su potencial para alimentación animal ha sido documentado en México (Aguirre-Medina & Garrido-Ramírez, 2002; Solorio & Solorio, 2008), Venezuela (Fernández, De Chávez & Virguez, 1997), Colombia (Mahencha, Rosales, Molina & Molina, 2004), Cuba (Cino, Díaz, Castillo & Hernández, 2011), entre otros.

Leucaena leucocephala presenta alta producción de biomasa, incluso en la época de secas, y tiene capacidad de rebrote después del corte y/o ramoneo, y esta respuesta se considera que está influenciada por su amplio crecimiento radical al asignar cantidades semejantes de fotosintatos, tanto para la biomasa radical como para la parte aérea (De la Garza, Valdés y Aguirre-Medina, 1997).

Las características morfológicas y fisiológicas de *Leucaena*, asociada a microorganismos benéficos, son una alternativa para enfrentar algunos problemas ambientales en las explotaciones ganaderas de las regiones tropicales. Como es el caso de las deficiencias de nitrógeno en las praderas, que se generan en parte por su lixiviación cuando se presentan las fuertes precipitaciones en estas regiones tropicales, aunadas a la dominancia de texturas medianas y gruesas en estos lugares, o bien, las deficiencias de fósforo debido a la condición ácida que los caracteriza. Además de considerar que tradicionalmente no se reponen los nutrientes extraídos por los bovinos en pastoreo. Así, las praderas de los trópicos reducen la disponibilidad de alimento alto en proteína para los bovinos durante la temporada de secas.

La corrección de la deficiencia de proteína en las pasturas tropicales es una de las consideraciones más importantes en la producción animal y ésta se puede hacer mediante la inclusión de las leguminosas en los sistemas de producción, como las del género *Leucaena*.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inoculación de la semilla a base de los microorganismos *R. intraradices* (Schenck et Sm.) Walker et Schuessler y *A. brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner y su efecto sobre el crecimiento de *Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit en vivero.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló de febrero a noviembre de 2010 en un vivero del Campo Experimental Rosario Izapa-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el Km 18 de la carretera Tapachula-Cacaohatán, municipio de Tuxtla Chico, Chiapas, localizado a 14°

40' LN y 92° 10' LO, a 435 msnm. El clima es cálido húmedo con lluvias en verano e influencia de monzón. La precipitación promedio es de 4,720 mm anuales y la temperatura media, considerada isothermal de 25.4 °C.

El suelo experimental pertenece al gran grupo andosol mólico y se obtuvo de los terrenos del mismo campo experimental mediante la limpieza del mantillo y excavación a una profundidad de 30 cm. A este suelo se le agregó arena de río lavada 1:1 (v/v) y el sustrato final tuvo los siguientes componentes y características físico-químicas: arena (82.7%), limo (14.3%), arcilla (4.16%), textura arena migajonosa, materia orgánica (2.8%), pH 5.5, N (0.12%), P (5.0 ppm), capacidad de intercambio catiónico (CIC: 4.12 mg · 100 g⁻¹), conductividad eléctrica (CE: 0.12 dS · m⁻¹). Con el mismo se llenaron las bolsas con capacidad de 5 kg, perforadas en la parte inferior para favorecer el drenaje y se colocaron sobre bancales de fierro.

Se utilizó semilla de *Leucaena leucocephala* cv. Perú, cosechado de una plantación de 10 años de establecida en el Campo Auxiliar "Jericó-INIFAP" ubicado en la colonia Miguel Alemán, del municipio de Pijijiapan, Chiapas.

El hongo *R. intraradices* con 40 esporas-g de suelo⁻¹ y 95% de colonización radical en la planta huésped de *Allium* cepa L. se desarrolló en Rosario Izapa-INIFAP. La bacteria *A. brasilense* fue adquirida en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) con 9 x 10⁶ Unidades Formadoras de Colonia (UFC.g de turba⁻¹). La cantidad de bacterias aplicada en las semillas de *L. leucocephala* fue de 6% del peso de la semilla del hongo micorrízico y del 4% del peso de la semilla de la bacteria. Los microorganismos fueron adheridos a las semillas con carboximetilcelulosa y después de este proceso fueron sembradas en las macetas a 3 cm de profundidad. Los riegos se hicieron con agua destilada cada tercer día. Los tratamientos, Testigo, *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense* y *R. intraradices* + *A. brasilense*, se distribuyeron en un diseño completamente al azar con 5 repeticiones.

Se registraron las variables altura de planta, biomasa seca de la raíz, tallo, hoja y área foliar con frecuencia de cada 15 días hasta el

día 105 días de edad de la planta. La altura de la planta se registró con cinta métrica midiendo de la corona radical hasta la yema apical. El área foliar (cm²) se obtuvo con la medición de los folíolos en un integrador de área foliar (LI-COR, LI 3000^a, USA). La materia seca se determinó en estufa de aire forzado por 72 horas a temperatura de 75-80 °C y los componentes del rendimiento de la parte aérea y radical se pesaron en báscula (Ohaus, Adventurer Pro, USA). Con estos datos se calcularon otros parámetros como la Tasa de Asimilación neta y el Área foliar específica.

Para determinar los efectos entre tratamientos se realizó un análisis de varianza para cada variable con el procedimiento PROC ANOVA. Posteriormente se aplicó una comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) utilizando el programa computacional Statistical Analysis System (SAS 1999-2000, versión 8.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 muestra la asignación de materia seca por componente del rendimiento, la altura de las plantas y el área foliar de *L. leucocephala* con los tratamientos aplicados.

La altura de las plantas mostró diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) durante los muestreos realizados a los 45 y 105 días después de la siembra (dds) cuando se inoculó *A. brasilense* y a los 30, 75 y 105 dds en el tratamiento en el cual se combinaron los dos microorganismos *Rhizophagus* y *Azospirillum*. La altura máxima alcanzada fue de 27 cm, se registró con los tratamientos citados y representó 28% más de incremento de altura con respecto al testigo. Existen resultados semejantes con los mismos microorganismos en otras especies perennes como *Theobroma cacao* L. (Aguirre-Medina, Mendoza-López, Cadena-Iñiguez & Avendaño-Arrazate, 2007) y *Coffea arabica* L. (Sánchez, Montilla, Rivera & Cupull, 2005; Aguirre-Medina et al., 2011).

Durante el primer muestreo, los tratamientos inoculados con los microorganismos presentaron menor altura en comparación con el testigo. Esta respuesta puede estar relacionada con la demanda de fotosintatos por parte de los microorganismos inoculados cuando se

Cuadro 1. Comparaciones de medias de biomasa seca, área foliar y altura de planta de *L. leucocephala* inoculada con microorganismos benéficos

Tiempo (dds)	Tratamientos	Altura (cm. planta ⁻¹)	Peso seco (g.planta ⁻¹)			Área foliar (cm ² .planta ⁻¹)
			Raíz	Hoja	Tallo	
15	Testigo	10.5± 0.28a*	0.0120±0.0003 b	0.037±0.0008 c	0.0154±0.0009b	10.76±0.29 c
	<i>R. intraradices</i>	8.00± 0.40 b	0.0153±0.0004b	0.045±0.0014 b	0.0131±0.0004c	13.68±0.49 bc
	<i>A. brasilense</i>	8.25± 0.14 b	0.0184±0.0002a	0.053±0.0017 a	0.0164±0.0001a	15.42±0.75b
	<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	9.25± 0.52 ab	0.0102±0.0002 c	0.052±0.0010 a	0.0174±0.0003a	20.65±1.23 a
	CV %	8.17	4.22	5.68	6.43	10.39
30	Testigo	8.00± 0.28 b	0.0156±0.0008 c	0.063±0.0005 b	0.0189±0.0002c	15.36±1.03 c
	<i>R. intraradices</i>	8.50± 0.28 ab	0.0245±0.0016b	0.064±0.0042 b	0.0198±0.0011c	23.29±1.41 b
	<i>A. brasilense</i>	9.00± 0.28 ab	0.0282±0.0008b	0.088±0.0043 a	0.0309±0.0006a	33.37±1.59 a
	<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	9.50± 0.28 a	0.0370±0.0015 a	0.088±0.0035 a	0.0271±0.0004b	38.52±3.18 a
	CV %	6.59	10.04	9.10	6.29	11.94
45	Testigo	9.00± 0.20 b	0.0187±0.0001 c	0.059±0.0007 c	0.0271±0.0005b	20.57±0.94 d
	<i>R. intraradices</i>	10.75± 0.43 a	0.0253±0.0003b	0.079±0.0030 b	0.0284±0.0021b	24.18±1.01 c
	<i>A. brasilense</i>	10.50± 0.20 a	0.0352±0.0003 a	0.112±0.0057 a	0.0356±0.0004a	38.87±0.88 b
	<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	9.75± 0.25 ab	0.0324±0.0016 a	0.117±0.0027 a	0.0328±0.0009ab	45.52±1.40 a
	CV %	5.77	6.5	7.73	8.3	7.74
75	Testigo	10.37± 0.55 b	0.0385±0.0036 c	0.123±0.0019 d	0.0487±0.0019 d	23.60±2.01 c
	<i>R. intraradices</i>	10.02± 0.31 b	0.0742±0.0066b	0.176±0.0075 c	0.0667±0.0031 c	33.41±0.77 b
	<i>A. brasilense</i>	12.25± 0.43 b	0.1227±0.0064 a	0.221±0.0063 b	0.0977±0.0051 b	43.68±1.51 a
	<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	14.87± 0.51 a	0.1325±0.0020 a	0.279±0.0113 a	0.1255±0.0037 a	49.88±1.09 a
	CV %	7.70	11.08	7.58	8.73	7.83
105	Testigo	19.50± 0.28 b	0.2812±0.0189 c	0.594± 0.0382b	0.2510±0.0161 b	121.91±4.93 d
	<i>R. intraradices</i>	21.62± 0.68 b	0.2622±0.0199 c	0.754±0.0622 b	0.3012±0.0135 b	170.88±1.00 c
	<i>A. brasilense</i>	27.62± 1.14 a	0.7312±0.0173 a	1.334±0.0424 a	0.6545±0.0119 a	239.64±12.1 b
	<i>Rhizophagus</i> + <i>Azospirillum</i>	27.12± 0.37 a	0.6305±0.0320b	1.169±0.0410 a	0.6575±0.0347 a	280.70±10.5 a
	CV %	5.90	9.56	9.74	9.06	8.3

*Letras diferentes en una columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Los valores son promedios de cinco repeticiones por muestreo y tratamiento ± el error estándar. CV: coeficiente de variación.

inicia la colonización. Se ha demostrado que en las etapas iniciales, la disponibilidad de carbohidratos hacia el vástago disminuye, y se incrementan hacia la raíz (Roveda & Polo, 2007).

En *Gmelina arborea*, Roxb Zambrano & Díaz (2008) citan que *A. brasilense* promovió mayor altura en combinación con *Glomus manihotis* y *G. occultum*. Los resultados citados en los tratamientos con los microorganismos solos o combinados posiblemente sea el resultado del aumento en la capacidad de absorción de las plantas micorrizadas (Leigh, Hodge & Fitter, 2009) y la mineralización y solubilización de nutrientes (Wright, Scholes, Read & Rolfe, 2005), o bien por el mayor crecimiento radical promovido por *A. brasilense* (Hungría, Campo, Souza & Pedroza, 2004). Estos antecedentes sugieren la contrastante funcionalidad

de las coinoculaciones en interacción con las plantas (Jaderlund, Arthurson, Granhall & Jansson, 2008).

La biomasa radical se incrementó en el presente estudio con la aplicación individual de *A. brasilense* y cuando se combinó con *R. intraradices*. Con *A. brasilense* fueron del orden de 91, 57, 46, 68 y 61% mayor en comparación con la biomasa radical del testigo a los 15, 30, 45, 75 y 105 dds, respectivamente. La mayor promoción del crecimiento radical con *A. brasilense* ha sido consignada (Hungría et al., 2004) como resultado de la producción de fitohormonas, como el ácido indol acético (Dobbelaere, Vanderleyden & Okon, 2003), que modifica la morfología e incrementan la biomasa radical y en combinación con *R. intraradices* se ha demostrado que induce efecto

sinérgico en la planta huésped (Sánchez et al., 2004; Diouf et al., 2005; Lalitha et al., 2011). En cambio, la inoculación individual con *R. intraradices* promovió menor crecimiento de la biomasa radical en todos los muestreos. Al parecer la hifa del hongo sustituye los pelos de la raíz y la planta transporta más fotosintatos a la parte aérea para la producción de biomasa. Resultados similares citan Aguirre-Medina & Kohashi (2002) en frijol inoculado con *Glomus macrocarpum*.

El peso seco de hoja se incrementó en todos los muestreos con las plantas inoculadas con *A. brasilense* y la combinación *R. intraradices* + *A. brasilense*. En estudios realizados con *L. leucocephala* inoculada con los microorganismos *Glomus intraradices*, *Rhizobium loti* y *A. brasilense* produjeron mayor incremento que el testigo en este mismo componente del rendimiento (Aguirre-Medina et al., 2007).

Durante el primer muestreo el peso seco del tallo fue estadísticamente mayor en el testigo que los obtenidos con los tratamientos inoculados ($P \leq 0.05$). En los muestreos siguientes, los tratamientos inoculados con los microorganismos, solos o combinados, presentaron mayor asignación de biomasa al tallo en comparación con el testigo y fueron estadísticamente superiores ($P \leq 0.05$). Resultados semejantes citan Aguirre-Medina et al. (2007), en el grosor del tallo de *T. cacao* L. con la inoculación de *A. brasilense* solo, mientras que en el presente estudio, la inducción del crecimiento del tallo se presentó además con la combinación *Rhizophagus* + *Azospirillum*. Existen evidencias en algunas comunidades vegetales, de que diversas especies de hongos son capaces de promover en forma diferencial el desarrollo vegetal. Otras observaciones demuestran la compatibilidad funcional entre las plantas y ciertas especies de hongos (Cuenca, Cáceres, Oirdobro, Hasmy & Urdaneta, 2007).

El área foliar se incrementó en todos los tratamientos inoculados con los microorganismos y superaron estadísticamente al testigo ($P \leq 0.05$) durante la evaluación. Con la inoculación de *Rhizobium loti* a *L. leucocephala*, Guevara y Guenni (2007) no encontraron diferencia estadística.

La Tasa de asimilación neta (TAN) indica la cantidad de biomasa acumulada en función del área foliar y el tiempo (Morales, Escalante & López, 2009). Es una medida de la eficiencia de las hojas para producir nuevo crecimiento vegetal. En el período de los 15 a los 30 dds fue semejante entre el testigo y los tratamientos *A. brasilense* y *A. brasilense* + *R. intraradices* (Figura 1A). En el siguiente período, que comprendió de los 30 a los 45 dds, se incrementó la TAN en los tratamientos con la inoculación individual de los microorganismos.

Durante el período de 45-75 dds se registró aumento en la TAN con la inoculación de los dos microorganismos juntos y cuando se inoculó solo *A. brasilense*, fueron superiores al testigo. Al final del estudio, que corresponde de los 75-105 dds, el tratamiento con *A. brasilense* solo presentó la TAN más alta en comparación con los otros tratamientos, seguido por el testigo, la inoculación de los dos microorganismos y al final *R. intraradices*.

En general, la dinámica del crecimiento de *L. leucocephala* presenta una etapa inicial de incremento seguida por la disminución del mismo, es decir, el tratamiento que incrementó su TAN en un período, fue el menor durante el siguiente período de evaluación, con efecto diferencial entre los microorganismos y en su aplicación, solos o inoculados juntos.

Este efecto sugiere el crecimiento modular de la planta en interacción con los microorganismos. Se establece mayor crecimiento en los tratamientos inoculados con los microorganismos en comparación con el testigo. El aumento en general del crecimiento se refleja por el aumento en el área foliar de las plantas.

El área foliar específica (AFE) representa la relación entre el tamaño de la lámina foliar y su peso (Charles-Edwards, 1982) y se induce por la adición de nuevas capas de células al tejido fotosintético con el concomitante incremento de su grosor (Milthorpe & Moorby, 1982). La mayor área foliar específica en todos los tratamientos se presentó durante los primeros tres muestreos y en los últimos dos disminuyó casi a la mitad (Figura 1B). El efecto anterior puede estar relacionado con el aumento en el tejido fotosintético de nuevas capas de células en esta

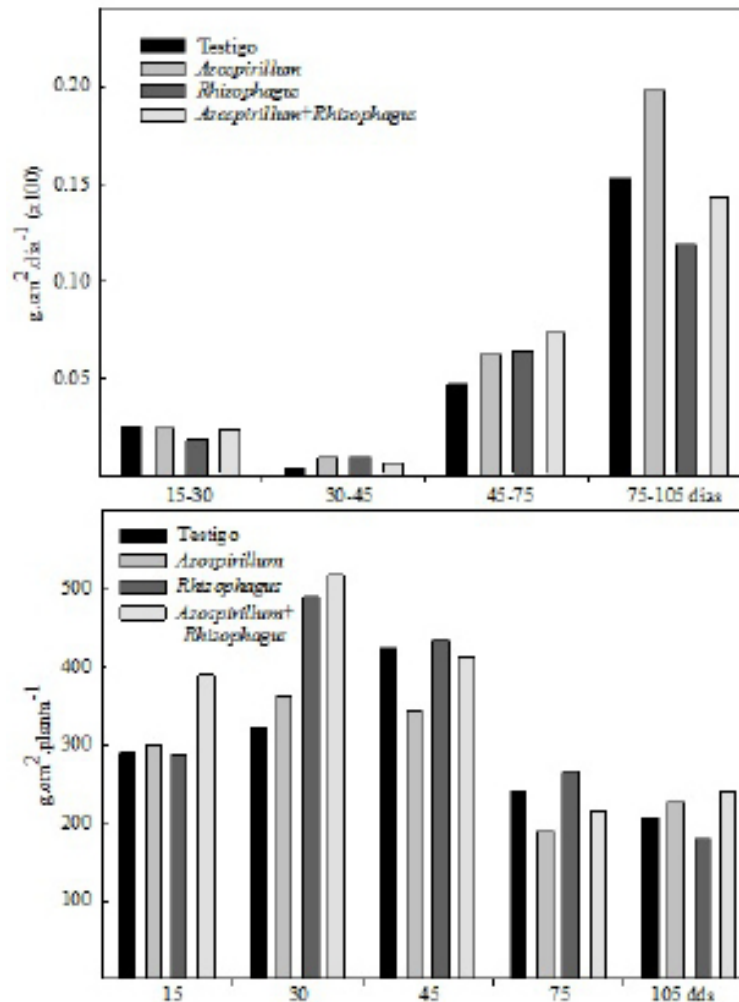


Figura 1. Tasa de asimilación neta (A) y Área Foliar Específica (B) de *L. leucocephala* (Lam.) De Wit, inoculada con *Azospirillum brasiliense* y/o *Rhizophagus intraradices* en condiciones de invernadero. Los valores son promedios de cinco plantas por tratamiento y muestreo.

etapa de crecimiento o bien, por el desarrollo de nuevas hojas. Por su parte, Calabria & Puntieri (2008) agregan que la disminución puede deberse al sombreado de las hojas inferiores en el dosel, que afectan su crecimiento y en consecuencia su AFE. Entre tratamientos, la respuesta inicial fue mejor cuando se inocularon juntos los dos microorganismos. En el segundo muestreo, el mejor incremento se presentó con el mismo tratamiento, pero también se incrementó cuando se aplicaron individualmente los microorganismos, especialmente con *R. intraradices*. En ambos tiempos, la respuesta fue superior al testigo. Durante el tercer muestreo casi todos los tratamientos presentaron la misma AFE. La disminución puede estar relacionada con el aumento en el grosor de las hojas viejas y la disminución en la emisión de nuevas

hojas. Mendoza-López (2003) encontró resultados semejantes en relación con *Azospirillum*.

El incremento en el grosor de las hojas se favorece con la absorción de nutrientes por el sistema radical y su transporte a la parte aérea y en interacción con la radiación solar para inducir fotosíntesis, la respiración, transpiración y el transporte de productos fotoasimilados, que se traducen en mayor producción de biomasa.

En general, las diferencias más contrastantes en el AFE de *L. leucocephala* se suceden en las primeras etapas de crecimiento cuando se inoculan los microorganismos. Según Milthorpe & Moorby (1982) hay una relación positiva entre el suministro de nutrientes minerales y la tasa de fotosíntesis que influyen en todo el complejo fotosintético. El incremento de nutrientes y la mejora en el abastecimiento de

agua a la planta huésped cuando se inoculan microorganismos y su concomitante incremento en biomasa, ha sido documentada (Aguirre-Medina, 2006).

La AFE es una de las principales variables que reflejan el crecimiento de las plantas por favorecer cambios en la razón de la área foliar, y la eficiencia fotosintética en el uso del nitrógeno (Bultynck, Fiorani & Lambers, 1999).

CONCLUSIONES

Se promovió respuesta diferencial en el crecimiento de *Leucaena leucocephala* por los microorganismos *Azospirillum brasilense* y *Rhizophagus intraradices* cuando se inocularon por separado y la combinación del hongo y la bacteria lograron inducir mayor desarrollo vegetal en las plantas en comparación con las inoculaciones solas de los mismos microorganismos y el testigo; los cambios en la asignación de materia seca más contrastantes se presentan 15 días después de la siembra. La máxima expresión vegetal se logró con la inoculación de los dos microorganismos combinados y son una buena alternativa para aumentar la biomasa de *Leucaena*.

La biomasa aérea se incrementó con la inoculación de los dos microorganismos juntos, y la radical cuando se aplicó solamente *A. brasilense*.

Los parámetros de crecimiento muestran incremento en la etapa inicial de desarrollo para el AFE y el efecto superior de la TAN en los tratamientos inoculados se presentó en la etapa intermedia de evaluación.

REFERENCIAS

Aguirre-Medina, J.F. & Velazco, Z.M.E. (1994). Componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento de *Leucaena leucocephala* al inocularse con micorriza VA y/o *Rhizobium loti*. Agricultura Técnica en México, 20 (1), 43-54.

Aguirre-Medina, J.F. & Kohashi-Shibata, J. (2002). Dinámica de la colonización micorrízica y su efecto sobre los componentes del rendimiento y el contenido de fósforo en frijol común. Agricultura Técnica en México, 28 (1), 23-33. <http://www.inifap.gob.mx/SitePages/revistas/rmca.aspx>

Aguirre-Medina, J.F. & Garrido-Ramírez, E.R. (2002). *Leucaena*: una alternativa para la alimentación animal en Chiapas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigaciones Regionales Pacífico Sur. Campo Experimental Rosario Izapa. México, DF. INIFAP.

Aguirre-Medina, J.F., Kohashi-Shibata, J., Trejo-López, C., Acosta Gallegos, J.A. & Cadena-Iñiguez, J. (2005). Inoculación de *Phaseolus vulgaris* L. con tres microorganismos y su efecto en tolerancia a sequía. Agricultura Técnica en México, 31, 125-137.

Aguirre-Medina, J.F. (2006). Biofertilizantes microbianos: Experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Centro de Investigaciones Regionales Pacífico Sur-Campo Experimental Rosario Izapa. México. INIFAP. Obtenido de <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3633>

Aguirre-Medina, J.F., Mendoza-López, A., Cadena-Iñiguez, J. & Avendaño-Arrazate, C.H. (2007). La Biofertilización del cacao (*Theobroma cacao* L.) en vivero con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner y *Glomus intraradices* Schenk et Smith. Interciencia, 32 (8), 1-6. Obtenido de <http://www.re-daly.org/articulo.oa?id=33932808>

Aguirre-Medina, J.F., Moroyoqui-Ovilla, D.M., Mendoza-López, A., Cadena-Iñiguez, J., Avendaño-Arrazate, C.H. & Aguirre-Cadena, J.F. (2011). Aplicación de *A. brasilense* y *G. intraradices* a *Coffea arabica* en vivero. Agronomía Mesoamericana, 22 (1), 1-10. Obtenido de http://www.mag.go.cr/rev_meso/v22n01_071.pdf

Aguirre-Medina, J.F., Aguirre-Cadena, J.F., Cadena-Iñiguez, J. & Avendaño-Arrazate, C.H. (2012). Biofertilización en plantas de la selva húmeda tropical. Montesillo, Edo. de México. Colegio de Postgraduados.

Augé, R.M. (2004). Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. Canadian Journal of Soil Science, 84(4), 373-381.

Bashan, Y., & De-Bashan, L. (2010). Chapter Two-How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-A Critical Assessment. Advances in Agronomy, 108, 77-136

Bultynck, L., Fiorani, F. & Lambers, H. (1999). Control of leaf growth and its role in determining variation in plant growth rate from an ecological perspective. Plant Biology, 1, 13-18.

Calabria, C. & Puntieri, J. (2008). Desarrollo foliar y caulinar de las unidades de alargamiento de *Nothofagus dombeyi* (Nothofagaceae) en condiciones de alta y baja luminosidad. Boletín Sociedad Argentina Botánica, 43 (1-2), 19-30.

Charles-Edwards, D.A. (1982). Physiological determinants of crop growth. Australia. Academic Press.

Cino, D.M., Díaz, A., Castillo, E. & Hernández, J.L. (2011). Ceba vacuna en pastoreo con *Leucaena leucocephala*: algunos indicadores económicos y financieros para la toma de decisiones. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 45 (1), 7-10.

Cuenca, G., Cáceres, A., Oirdobro, G., Hasmy, Z. & Urdaneta, C. (2007). Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. Interciencia, 32(1), 23-29.

De la Garza, H., Valdés, M. & Aguirre-Medina, J.F. (1987). Effect of *Rhizobial* strains, Phosphorus and soil type on nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. Leucaena Research Reports, 8, 42-43.

Diouf, D., Duponnois, R., Ba, At., Neyra, M. & Lesueur, D. (2005). Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium spp.* improves salt tolerance in greenhouse conditions. Functional Plant Biology, 32, 1143-1152.

Dobbelaere, S., Vanderleyden J. & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Rev. Plant Sciences, 22, 107-149.

Dong, L.Q. & Zhang, K.Q. (2006). Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party Interaction. Plant and Soil, 288(1-2), 31-45.

Fernández, L.R., De Chávez, M. & Virgúez, T.D. (1997). Uso de leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Witt) en pastoreo restringido para la suplementación de vacas lecheras. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 5(Supl. 1), 129-131.

Guevara, E. & Guenni, O. (2007). Potencial de crecimiento de cuatro líneas de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit durante el establecimiento. Sitio Argentino de Producción Animal. APPA-ALPA-Cusco, Perú, 1-8.

- Harrier, L.A. & Watson, C.A. (2004). The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Management Science*, 60 (2), 149-157.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M. & Pedrosa, F.O. (2004). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331, 413-425. Doi: 10.1007/s11104-009-0262-0
- Jäderlund, L., Arthurson, V., Granhall, U. & Jansson, J.K. (2008). Specific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria: as revealed by different combinations. *FEMS Microbiol Letters*, 287(2), 174-180.
- Kennedy, A.C. (2005). Rhizosphere. In: M.D. Sylvia, J.J. Fuhrmann, G.P. Harte, A.D. Zuberer (Eds.), *Principles and Applications of Soil Microbiology* (pp. 242-262). 2nd Edition. New Jersey, USA. Pearson Prentice-Hall.
- Lalitha, S., Rajeshwaran, K., Senthil Kumar, P. & Deepa, S. (2011). Role of AM fungi and rhizobial inoculation for reclamation of phosphorus deficient soil. *Asian Journal of Plant Science*, 10(3), 227-232.
- Leigh, J., Hodge, A. & Fitter, A.H. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist*, 181, 199-207. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02630.x
- Mahecha, L., Rosales, M., Hernando Molina, C. & Molina, J.E. (2004). Experiencias en un sistema silvopastoril de *Leucaena leucocephala*-*Cynodon plectostachyus*-*Prosopis juliflora* en el Valle del Cauca, Colombia. *Agroforestería para la Producción Animal en Latinoamérica*, pp. 325-336.
- Mendoza López, A. (2003). La biofertilización del cacao *Theobroma cacao* L. en etapa de vivero con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Dobereiner y *Glomus intraradices* Schenk et Smith. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus IV. Ingeniero Agrónomo Tropical. Huehuetán, Chiapas. 109 pp.
- Milthorpe, F.L. & Moorby, J. (1982). *Introducción a la fisiología de los cultivos*. Argentina, Ed. Hemisferio Sur.
- Mishra, S., Sharma, S. & Vasudevan, P. (2011). Role of bioinoculants and organic fertilizers in fodder production and quality of leguminous tree species. *Journal of Environmental Biology*, 32 (1), 57-64.
- Morales, R.E.J., Escalante, E.J.A. & López, S.J.A. (2009). Biomasa y rendimiento de frijol con potencial ejotero en unicultivo y asociado con girasol. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(1), 33-39.
- Roveda, R. & Polo, C. (2007). Mecanismos de adaptación de maíz asociado a *Rhizophagus spp.* en suelos con bajo fósforo disponible. *Agronomía Colombiana*, 25(2), 349-356. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/1803/180320296019.pdf>
- Sanchez, L., Weidmann, S., Brechenmacher, L., Batoux, M., van Tuinen, D., Lemanceau, P., Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (2004). Common gene expression in *Medicago truncatula* root in response to *Pseudomonas fluorescens* colonization, mycorrhiza development and nodulation. *New phytologist*, 161(3), 855-863.
- Sánchez, C., Montilla, E., Rivera, R., & Cupull, R. (2005). Comportamiento de 15 cepas de hongos micorrizógenos (HMA) sobre el desarrollo de posturas de café en un suelo pardo gleyoso. *Revista Forestal Latinoamericana*, 38, 83-95.
- Solorio, S.F.J. & Solorio, S.B. (2008). Manual de manejo agronómico de *Leucaena leucocephala*. *Leucaena leucocephala* (guaje) una opción forrajera en los sistemas de producción animal en los trópicos. Morelia, Mich. México. Fundación Produce Michoacán.
- Statistical Analysis System (SAS). 1999-2000. *SAS/STAT user's Guide: Ver 8.1* SAS Institute Inc. Cary NC, USA: SAS Institute Inc.
- Sylvia, M.D. (2005). Mycorrhizal symbioses. In: M.D. Sylvia, J.J. Fuhrmann, G.P. Harte, & A.D. Zuberer (Eds.). *Principles and Applications of Soil Microbiology* (pp. 263-282) 2nd Edition, New Jersey, USA. Pearson Prentice-Hall.
- Wencomo, H.B. & Lugo, J. (2013). Rendimiento de materia seca y otros componentes en *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham con el uso del Liplant. *Pastos y Forrajes*, 36, (1), 43-49.
- Wright, D.P., Scholes, J.D., Read, D.J. & Rolfe, S.A. (2005). European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New phytologist*, 167, 881-896. doi.10.1111/j.1469-8137.2005.01472.x
- Zambrano, J.A. & Díaz, L.A. (2008). Efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* y *Glomus sp.* en *Gmelina arborea* durante su germinación y manejo en vivero. *Universitas Scientiarum*, 13(2), 162-170. Obtenido de http://www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum.
- Zárate, P.S. (1994). Revisión del género *Leucaena* en México. *Anales del Instituto de Biología Serie Botánica*, 65, 83-162.