

INOCULACIÓN CON HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES Y EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE LEUCAENA

Effect of Inoculating Leucaena Seedlings with AM Fungi

María del Rocío Flores-Bello¹, Sergio Aguilar-Espinosa², Ramón García Calvario¹,
Alejandra Zamora Cruz², Javier Farias-Larios² y José Gerardo López-Aguirre^{2‡}

RESUMEN

Leucaena leucocephala (leucaena) es una leguminosa forrajera que puede ser usada como complemento proteico para animales. Sin embargo, presenta problemas para su establecimiento. Tomando en cuenta que es una leguminosa y estas son susceptibles a asociarse con hongos micorrízico-arbusculares (HMA), el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de *Glomus intraradices* y *G. etunicatum* en el crecimiento de *L. leucocephala* bajo condiciones de vivero. La altura, el número de hojas y el diámetro de tallo se tomaron cada siete días durante el periodo del experimento, al final se determinó la colonización micorrízica y la longitud radicular. En las plantas inoculadas con ambos hongos la altura óptima de trasplante (30 cm) se alcanzó a los 83 días, en lugar de los 90 a 120 días normalmente requeridos. Los valores más altos se registraron en todas las variables de las plantas inoculadas con *G. intraradices* ($P \leq 0.05$). Los resultados sugieren que este hongo puede ser una opción para mejorar la producción de plántulas de leucaena en vivero.

Palabras clave: *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *micorriza arbuscular*, *leguminosa*, *forrajes*, *proteínas*, *longitud de raíz*.

SUMMARY

Leucaena leucocephala (leucaena) is a forage legume that can be used as a protein complement

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ² Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima., Autopista Colima-Manzanillo km. 40, Apdo. Postal 36, 28100 Tecmán, Col., México.

‡ Autor responsable (jglopez@uocol.mx)

for animals. However, establishment of this plant species presents some problems. Considering that legumes are highly susceptible to association with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, this work was conducted to determine the effect of *Glomus intraradices* and *G. etunicatum* on the growth of *L. leucocephala* under nursery conditions. Height, number of leaves, and stem diameter were recorded every seven days during the experiment. Mycorrhizal colonization and root length were determined at the end of the experiment. The optimal height for transplanting (30 cm) was achieved at 83 days; which is normally required from Day 90 till 120. The highest values were found in all plant variables inoculated with *G. intraradices* ($P \leq 0.05$). These results suggest that these AM fungi may be an option for improving production of leucaena seedlings in nursery.

Index words: *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *arbuscular mycorrhiza*, *legume*, *forages*, *protein*, *root length*.

INTRODUCCIÓN

El incremento de la población mundial y la correspondiente necesidad de productos agrícolas han estimulado la necesidad de aumentar la productividad de forrajes y cultivos (Cantrell y Linderman, 2001). En muchas áreas, especialmente en las regiones áridas y semiáridas, la producción animal está limitada por una amplia deficiencia de proteínas, particularmente en regiones con sequía prolongada cuando la calidad del forraje es más baja. Las leguminosas proveen nitrógeno al sistema suelo, el cual es tomado por las plantas y transformado a proteínas las que al ser consumidas por los animales incrementan la producción de carne, sin necesidad de aplicar fertilización química (Stamford *et al.*, 1997; 2000).

Leucaena leucocephala es una leguminosa muy utilizada en bancos de proteína (Valdés, 1992), ya que puede proporcionar hasta un 22% de ésta (Brewbaker, 1987; Suárez, 1994), lo que la hace un forraje de buena

calidad en la dieta de los animales (Brewbaker, 1987). La leucaena es un arbusto de porte alto que se adapta a diversos suelos, además es muy resistente al pastoreo. El desarrollo de bancos de proteína permite sustituir el uso de concentrados de importación o la alimentación complementaria, por esto, la leucaena debe ser tratada como un cultivo de alto valor, tanto alimenticio como económico, además si se maneja adecuadamente puede persistir indefinidamente. Por estas razones, todas las inversiones que se hagan para su establecimiento están justificadas y serán recompensadas en términos económicos y de producción (Valdés, 1992).

La explotación intensa de agrosistemas naturales y agropecuarios en los trópicos es la responsable de la degradación de los ecosistemas estables. Entre los cambios bióticos se incluye una disminución en la densidad de esporas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), aspecto que no debe ser pasado por alto, debido al efecto de los HMA en el establecimiento y crecimiento de plántulas, lo que se ha demostrado a través de los resultados positivos obtenidos con plantas inoculadas con HMA al ser trasplantadas (Michelsen y Rosendahl, 1990). Tomando en cuenta la importancia que la leucaena tiene como planta forrajera y su transformación a proteína animal para consumo humano y el tener una raíz pivotante (Suárez, 1994), la hace un modelo de estudio importante para continuar el estudio de su relación con los HMA (Morton y Benny, 1990), además de que el uso de estos microorganismos permite lograr una agricultura sostenible que resulta práctica y económica, y también favorece el reciclaje de nutrientes para mejorar la fertilidad del suelo, por lo tanto, se convierte en una alternativa para contribuir al establecimiento de sistemas de producción sostenibles, competitivos y rentables (Molina *et al.*, 2005).

Los HMA forman abundantes hifas externas y estimulan el desarrollo de las raíces con lo que aumenta la capacidad del sistema radical para absorber y trasladar elementos, principalmente el fósforo, lo que mejora el crecimiento de la planta (Daniels-Hylton y Ahmad, 1994). Las leguminosas y los pastos que crecen en condición natural o de cultivo generalmente establecen asociación con HMA (Saif, 1987; Khasa *et al.*, 1992). Esta asociación no presenta especificidad, aunque cada día hay más evidencias de que algunos HMA pueden formar asociaciones preferenciales con ciertas plantas hospedantes (Secilia y Bagyaraj, 1992). De este modo, la eficiencia dependerá, parcialmente,

de las características del hongo simbionte (Abbott y Robson, 1986). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de dos cepas de *Glomus* en la respuesta de crecimiento de *Leucaena leucocephala* en condiciones de vivero.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el área de posgrado de la Universidad de Colima, ubicado a 103° 52' O, 18° 55' N con una altitud de 33 m, con precipitación media anual de 750 mm y una temperatura promedio anual de 26 °C. El experimento se realizó en el vivero a una temperatura promedio de 22 °C (Estación meteorológica, Universidad de Colima).

Material Biológico

Las semillas de leucaena que se utilizaron para el experimento provenían de plantas silvestres de la zona cercana a la localidad denominada Cofradía de Juárez, municipio de Armería, Colima. Las semillas se desinfectaron superficialmente con solución de formol durante 30 min, posteriormente fueron lavadas cuatro veces con agua destilada estéril y después se escarificaron mecánicamente lijando la testa ligeramente.

Los dos hongos micorrícicos empleados fueron *Glomus etunicatum* Becker y Gerdemann (aislado UT-123) y *Glomus intraradices* Schenck y Smith (aislado WV-944), adquiridas en la West Virginia University, Virginia, USA.

Propagación del Inóculo Micorrícico

Las cepas se propagaron en condiciones de invernadero, usando *Panicum maximum* y *Phaseolus vulgaris* cv. negro jamapa, como cultivos trampa, en recipientes de plástico con capacidad de 40 kg de sustrato, por seis meses (dos generaciones del frijol); el sustrato utilizado fue arena:suelo (2:1 v/v) previamente tratado en autoclave por dos horas. Durante el periodo de propagación, los recipientes se regaron cada siete días con la solución nutritiva Long Ashton (Sutcliffe y Baker, 1976), agregando un cuarto de la cantidad propuesta de fósforo en dicha solución. Al término de la propagación, antes de ser usado, el inoculante se almacenó a 10 °C por 10 días para romper la latencia de las esporas.

Germinación y Trasplante

La germinación de las semillas de leucaena se llevó a cabo en charolas de germinación que contenían arena tratada con calor húmedo a una temperatura de 120 °C durante 120 min. A los 20 días, se seleccionaron plántulas de tamaño uniforme y se trasplantaron en bolsas de polietileno negras (10 x 30 cm) con una mezcla de suelo:arena (2:1), previamente desinfectadas con alcohol al 70%.

Inoculación

Las plántulas se inocularon con uno u otro hongo mediante la técnica de inoculación, propuesta por Brundrett y Abbott (1991), para la que se empleó un promedio de 1000 esporas (Huante *et al.*, 1993). Se utilizaron 24 repeticiones para cada uno de los tratamientos incluyendo al testigo (sin inocular). Su distribución fue completamente al azar con redistribución semanal.

Colonización Micorrícica

Al finalizar el experimento, la colonización micorrícica se determinó mediante la técnica de laminilla (Giovannetti y Mosse, 1980), por lo que las raíces fueron clareadas en KOH al 10% y teñidas con fucsina ácida (Kormanik y McGraw, 1982).

El experimento desde la siembra hasta la cosecha concluyó a los 99 días. Las plántulas estuvieron 15 días en charola a partir de la germinación y a partir de los 35 días posteriores al trasplante se tomaron datos cada siete días por siete semanas. Las variables medidas fueron: altura de planta, diámetro de tallo, número de hojas y volumen de la parte aérea.

Los datos se procesaron mediante análisis de varianza con $P \leq 0.05$, mediante prueba de medias de Tukey, usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La altura óptima de trasplante de 30 cm se alcanzó entre los 76 y 83 días, esto es, antes de los 90 a 120 días que requiere de manera habitual (Brewbaker, 1987) con 38.25 cm y 37.5 cm para *G. intraradices* y *G. etunicatum*, respectivamente (Cuadro 1). En cuanto al número de hojas, ambos HMA indujeron un comportamiento similar (Cuadro 2). Respecto al diámetro de tallo (Cuadro 3), a partir de los 76 días se registraron diferencias significativas respecto al testigo, mientras que en las dos últimas fechas de muestreo (90 y 97 días), las plantas inoculadas con *G. intraradices* presentaron las mayores diferencias.

En el Cuadro 4 se muestran los valores de la micorrización al final del experimento, donde no se presentaron diferencias entre ambos hongos, así como

Cuadro 1. Efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares sobre la altura de *Leucaena leucocephala* a diferentes días después del trasplante.

Hongo	Días después del trasplante						
	55	62	69	76	83	90	97
	----- cm -----						
<i>Glomus intraradices</i>	9.446 a [†]	13.917 a	19.854 a	28.429 a	38.250 a	40.792 a	50.687 a
<i>Glomus etunicatum</i>	9.929 a	14.663 a	19.242 a	28.792 a	37.692 a	40.167 a	44.271 b
Testigo	7.762 b	8.850 b	10.483 b	13.687 b	17.333 b	18.937 b	19.479 c

[†] Valores en columnas con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, $P = 0.05$).

Cuadro 2. Efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares sobre el número de hojas de *Leucaena leucocephala* a diferentes días después del trasplante.

Hongo	Días después del trasplante						
	55	62	69	76	83	90	97
	----- cm -----						
<i>Glomus intraradices</i>	6.542 a [†]	8.083 a	8.500 a	9.292 a	10.125 a	10.583 a	11.417 a
<i>Glomus etunicatum</i>	6.417 a	7.667 a	8.250 a	9.083 a	9.417 a	10.000 a	10.792 a
Testigo	5.125 b	5.417 b	5.720 b	6.417 b	6.333 b	7.375 b	6.958 b

[†] Valores en columnas con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, $P = 0.05$).

Cuadro 3. Diámetro del tallo por efecto de la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares de *Leucaena leucocephala* en diferentes días después del trasplante.

Hongo	Días después del trasplante						
	55	62	69	76	83	90	97
	----- cm -----						
<i>Glomus intraradices</i>	0.140 a [†]	0.152 a	0.175 a	0.213 a	0.290 a	0.341 a	0.367 a
<i>Glomus etunicatum</i>	0.140 a	0.152 a	0.169 ab	0.219 a	0.280 a	0.297 b	0.330 b
Testigo	0.143 a	0.134 a	0.154 b	0.184 b	0.228 b	0.240 c	0.277 c

[†] Valores en columnas con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, $P = 0.05$).

para longitud radicular, incluyendo en este caso al testigo. Ahiabor e Hirata (1995), al estudiar un grupo de leguminosas, no observaron respuestas significativas en la longitud radical y, en cambio, se produjo una mayor cantidad de raíces delgadas, lo que coincide con los resultados observados en las plantas de leucaena micorrizadas en el presente experimento.

En general, los dos hongos micorrícicos promovieron el crecimiento y desarrollo vegetativo de las plantas y resultaron igualmente infectivos, sin embargo, los resultados del último muestreo indican que *G. intraradices* fue más efectivo para promover el crecimiento.

Lo anterior coincide con lo reportado por Ahiabor e Hirata (1995) quienes, al probar varias especies de hongos micorrícicos arbusculares del mismo género sobre tres especies de leguminosas, observaron que el crecimiento de estos vegetales dependió de la combinación planta-hongo. Así mismo, Abbott y Robson (1985) indican que la infectividad (habilidad para colonizar las raíces) y la efectividad de HMA (habilidad para estimular el crecimiento) aparentemente varía dependiendo del hongo y el hospedero. Estos mismos autores sostienen que *G. intraradices* puede ser más efectivo debido a su capacidad para colonizar rápidamente y formar una extensa y efectiva red externa de hifas alrededor de las raíces que facilita la adquisición de nutrimentos. Es probable que a esto se deban los resultados del presente trabajo.

Cuadro 4. Colonización micorrícica arbuscular y longitud de raíz en *Leucaena leucocephala* a los 97 días después del trasplante.

Hongo	Micorrización	Longitud de la raíz
	%	cm
<i>Glomus etunicatum</i>	61.00 a [†]	25.5 a
<i>Glomus intraradices</i>	59.25 a	26.6 a
Testigo	00.00 b	31.0 a

[†] Valores en columnas con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, $P = 0.05$).

Al mejorar el crecimiento de las plántulas de leucaena micorrizadas se demuestra el potencial de la inoculación micorrícica en la producción de plántulas que resisten el trasplante (Michelsen y Rosendahl, 1990) y, como consecuencia, serán probablemente competidoras más exitosas en ambientes con niveles bajos de nutrimentos que aquellas plantas no colonizadas con estos hongos (Majunath y Habte, 1989). Rey *et al.* (2005) obtuvieron resultados similares con respecto a la altura de planta y colonización; estos autores utilizaron una doble inoculación, tanto de HMA como de rizobios.

CONCLUSIONES

Glomus intraradices es una opción para asociarse simbióticamente con leucaena durante su estancia en el vivero, ya que las plantas asociadas con este hongo disminuyeron el tiempo de manejo de las plántulas de leucaena en el vivero. Esto repercutirá directamente en la obtención de plantas vigorosas que podrán superar mejor el trasplante. Es recomendable continuar los estudios realizando determinaciones acerca del contenido proteínico de las plantas y, con ello, establecer el efecto de las aplicaciones de los hongos micorrícico-arbusculares (HMA) en este cultivo de una manera más precisa.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Colima su apoyo para la realización de este trabajo, el cual se realizó con apoyo del Fondo Ramón Álvarez-Buylla de Aldana.

LITERATURA CITADA

Abbott, L. K. and A. D. Robson. 1985. Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 99: 245-255.

- Abbott, L. K. and A. D. Robson. 1986. Managing vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi to increase the efficiency of fertilizer use. *Rev. Rural Sci.* 6: 198-206.
- Ahiabor, B. D. and H. Hirata. 1995. Influence of growth stage on the association between some tropical legumes and two variant species of *Glomus* in an Andosol. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41: 481-496.
- Brewbaker, J. L. 1987. *Leucaena*: a multipurpose tree genus for tropical agroforestry. pp. 289-320. *In*: H. A. Steppeler and P. K. R. Nair (eds.). *Agroforestry, a decade of development*. International Council for Research on Agroforestry. Nairobi, Kenya.
- Brundrett, M. C. and L. K. Abbott. 1991. Roots of Jarrah forest plants. I. Mycorrhizal associations of shrubs and herbaceous plants. *Aust. J. Bot.* 39: 445-457.
- Cantrell, I. C. and R. G. Linderman. 2001. Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant Soil* 233: 269-281.
- Daniels-Hylton, K. D. M. and M. H. Ahmad. 1994. Inoculation response in kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to vesicular-arbuscular fungi and rhizobia in non-sterilized soil. *Biol. Fertil. Soils* 18: 95-98.
- Giovannetti, M. and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Huante, P., E. Rincón, and E. B. Allen. 1993. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on seedling growth of four tree species from the tropical deciduous forest in Mexico. *Mycorrhiza* 2: 141-145.
- Khasa, P., V. Furlan, and J. A. Fortin. 1992. Response of some tropical plant species to endomycorrhizal fungi under field conditions. *Trop. Agric. (Trinidad)*. 69: 279-283.
- Kormanik, P. P. and A. C. McGraw. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. pp. 37-45. *In*: N. C. Schenk (ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA.
- Majunath, A. and M. Habte. 1989. Rate variables associated with P uptake, utilization and growth of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Leucaena leucocephala*. *J. Plant Nutr.* 12: 755-768.
- Michelsen, A. and S. Rosendahl. 1990. The effect of VA mycorrhizal fungi, phosphorus and drought stress on the growth of *Acacia nilotica* and *Leucaena leucocephala* seedlings. *Plant Soil* 124: 7-13.
- Molina L., M., L. Mahecha y M. Medina. 2005. Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18: 162-175.
- Morton, J. B. and G. L. Benny. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Rey, A. M., D. R. Chamorro y M. Ramírez. 2005. Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad de forraje de *Leucaena leucocephala*. *Rev. Corpoica* 6: 52-59.
- Saif, S. R. 1987. Growth responses of tropical forage plant species to vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Plant Soil* 97: 25-35.
- SAS Institute. 1999. SAS User's guide: statistics. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Secilia, J. and D. J. Bagyaraj. 1992. Selection of efficient vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Biol. Fertil. Soils* 13: 108-111.
- Stamford, N. P., A. D. Ortega, F. Temprano, and D. R. Santos. 1997. Effects of phosphorus fertilization and inoculation of *Bradyrhizobium* and mycorrhizal fungi on growth of *Mimosa caesalpiniaefolia* in an acid soil. *Soil Biol. Biochem.* 29: 959-964.
- Stamford, N. P., J. T. Araújo Filho, and A. J. N. Silva. 2000. Growth and nitrogen fixation of *Leucaena leucocephala* and *Mimosa caesalpiniaefolia* in a saline soil of the Brazilian semi-arid region as affected by sulphur, gypsum and saline water. *Trop. Grasslands* 34: 1-6.
- Suárez, J. J. 1994. Banco proteico de leucaena forrajera. *Asociación Cubana de Producción Animal* 2: 28-33.
- Sutcliffe, J. F. and D. A. Baker. 1976. *Plants and mineral salts*. Camelot Press. London, UK.
- Valdés, L. R. 1992. Banco de proteínas para la ganadería Cubana. *Asociación Cubana de Producción Animal* 1: 12-18.