

# INOCULACIÓN DE ALFALFA CON HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y RIZOBACTERIAS EN DOS TIPOS DE SUELO

## Alfalfa Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobacteria in Two Soil Types

Chamizo, A.<sup>1</sup>, R. Ferrera-Cerrato<sup>1‡</sup>, M. C. González-Chávez<sup>1</sup>, C.A. Ortiz-Solorio<sup>1</sup>,  
J. A. Santizo-Rincón<sup>1</sup>, L. Varela<sup>2</sup> y A. Alarcón<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se evaluó el efecto del consorcio *Glomus* spp. Zacatecas 19 (Zac19), seis cepas de rizobacterias (*Pseudomonas aeruginosa* 11PS, *Burkholderia cepacia* P13, *Hafnia alvei* aislamientos S1AS, P25 y P27, *Enterobacter cloacae* S3DER) y dos tipos de suelos (limoso y arenoso) en alfalfa (*Medicago sativa* L. var. Valenciana), en invernadero. Se estableció un experimento factorial 2 x 2 x 7 en un diseño experimental completamente al azar, con seis repeticiones por tratamiento. La inoculación de Zac19 estimuló significativamente el crecimiento y el estado nutricional (NPK) de alfalfa, en particular en suelo limoso. Se observó sinergismo entre Zac19 y las rizobacterias *H. alvei* aislamientos P25 y P27, con *P. aeruginosa* 11PS y con *E. cloacae* S3DER. Las bacterias se comportaron diferencialmente, al inocularse en forma individual o con el consorcio Zac19. Existió sinergismo entre Zac19 con *P. aeruginosa* 11PS y *H. alvei* P25, para la absorción de N; mientras que la doble inoculación de Zac19 y las cepas *P. aeruginosa* 11PS, *H. alvei* P25 y P27, y *B. cepacia* P13, resultó en sinergismo para la absorción de P y K. El tipo de suelo fue un factor determinante en el comportamiento y en la expresión del beneficio hacia la planta, tanto por la inoculación de las rizobacterias, como por el consorcio micorrízico Zac19. Las rizobacterias *P. aeruginosa* 11PS y las cepas *H. alvei* S1AS, P25 y P27, tienen potencial de uso como promotoras del crecimiento de alfalfa.

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230 Montecillo, Estado de México.

<sup>‡</sup> Autor responsable (ronaldfc@colpos.mx)

<sup>2</sup> Laboratorio de Ecología Microbiana, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 07738 México, D. F.

Recibido: febrero de 2006. Aceptado: mayo de 2009.  
Publicado en Terra Latinoamericana 27: 197-205.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Hafnia alvei*, *Glomus*, bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).

### SUMMARY

The effect of the arbuscular mycorrhizal fungal consortium *Glomus* spp. Zacatecas 19 (Zac19), six rhizobacteria strains (*Pseudomonas aeruginosa* 11PS; *Burkholderia cepacia* P13; *Hafnia alvei* isolates S1AS, P25 and P27, and *Enterobacter cloacae* S3DER), and two soil types (silt and sandy soil) on alfalfa (*Medicago sativa* L. var. Valenciana) was studied by using a complete randomized 2 x 2 x 7 factorial design with six replicates per treatment. Inoculation of *Glomus* Zac19 significantly enhanced growth and nutritional status (NPK) of alfalfa, particularly in silt soil. A synergistic effect was observed between Zac19 and the rhizobacteria *H. alvei* P25 and P27, *P. aeruginosa* 11PS, and *E. cloacae* S3DER. Bacteria showed effect variations when they were inoculated alone or in combination with Zac19. Nitrogen content was synergistically enhanced due to the inoculation of Zac19 with *P. aeruginosa* 11PS and *H. alvei* P25, whereas P and K content was improved by the dual inoculation of Zac19 with *P. aeruginosa* 11PS, *H. alvei* P25 and P27, or *B. cepacia* P13. Soil type was a significant factor in the behavior and in the expression of beneficial effects to the plant through the inoculation of the rhizobacteria and the arbuscular mycorrhizal consortium Zac19. The rhizobacteria *P. aeruginosa* 11PS, *H. alvei* S1AS, P25, and P27 have potential utilization as growth promoting agents of alfalfa.

**Index words:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Hafnia alvei*, *Glomus*, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR).

## INTRODUCCIÓN

Muchas especies microbianas del suelo realizan actividades que benefician a las plantas (Robles y Barea, 2004). Entre éstas se encuentran los hongos micorrízicos y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocidas como PGPR (bacterias promotoras del crecimiento vegetal, por sus siglas en inglés) (Díaz *et al.*, 2001). La simbiosis micorrízica se establece entre las raíces de las plantas y algunos hongos del suelo. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) forman una simbiosis mutualista con las raíces de aproximadamente 80% de las plantas vasculares (Smith *et al.*, 2003). Los HMA son simbiosis obligados que dependen del aporte de carbono derivado de la planta hospedante para satisfacer sus requerimientos energéticos (Alarcón *et al.*, 2003; Troe y Loynachan, 2003). A su vez, los HMA aportan a la planta nutrientes minerales y agua, debido a la capacidad de exploración de las hifas del hongo, lo que le permite tener acceso a recursos distantes al sistema radical (Bago *et al.*, 2000). Las hifas extraradicales de los HMA contribuyen en la absorción de hasta 80% de fósforo, 10% de potasio, 25% de zinc, 60% de cobre y 25% de nitrógeno de la planta (Allen *et al.*, 2003). Por otra parte, en la rizosfera cohabitan numerosas especies de bacterias que pueden estimular el desarrollo de las plantas. Esta estimulación puede ser por síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y control de fitopatógenos del suelo (Loredo-Osti *et al.*, 2004).

Existen aislamientos mixtos de HMA, como es el caso del consorcio *Glomus* spp. Zac19 constituido por *Glomus albidum*, *G. diaphanum* y *G. claroides* (Chamizo *et al.*, 1998). Este consorcio se ha caracterizado por promover tanto el crecimiento vegetal, como el estado nutricional de plantas de importancia hortofrutícola (Rodríguez-Elizalde *et al.*, 2000; Alarcón *et al.*, 2003; Cartmill *et al.*, 2008). En tanto que la doble inoculación de este consorcio micorrízico y rizobacterias ha estimulado el área foliar, la concentración de fósforo en hojas, la producción total de flores, el peso de frutos, el número de semillas y la producción de polen en plantas de tomate (Velasco *et al.*, 2001). Sin embargo, no se ha estudiado la influencia de los diferentes tipos de suelo en el crecimiento y la nutrición de las plantas en las que se combina la inoculación de HMA y rizobacterias benéficas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de plantas de alfalfa a la inoculación del consorcio *Glomus* spp. Zac19 en combinación con algunas rizobacterias, considerando dos suelos con diferente textura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en condiciones de invernadero, con suelo pasteurizado, el cual se mantuvo a presión de vapor de agua durante 1 h. A las 24 h, este procedimiento se volvió a realizar durante 1 h y el suelo se dejó reposar un día antes de usarlo.

Los suelos se obtuvieron a través del Laboratorio de Génesis, Morfología y Clasificación de Suelos, en el Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados campus Montecillo. El suelo arenoso fue recolectado de una parcela ubicada en el Colegio de Postgraduados, y el suelo limoso de una parcela cultivada con maíz, proveniente del ejido de San Salvador Atenco, Estado de México, con clasificación de alta productividad. Ambos suelos se clasifican como Typic Ustifluent, de acuerdo con la taxonomía de suelo (Soil Survey Staff, 1995). El suelo de textura limosa presentó las siguientes características: textura franca, con 31% de arena, 40% de limo y 29% de arcilla; pH (1:2 p/v, en agua) de 7.4; contenido pobre de materia orgánica (1.5%) determinado por el método de Walkley-Black (Etchevers *et al.*, 1971); contenido pobre de nitrógeno total (0.07%) de acuerdo con el método de Kjeldahl (Moreno, 1978); contenido medio de fósforo (9 mg kg<sup>-1</sup>) según el método de Olsen (SPAC, 1992); y alto contenido de potasio intercambiable (2.06 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>), determinado con acetato de amonio a pH 7.0 (Etchevers *et al.*, 1971). El suelo arenoso tuvo textura franco arcillo-arenosa (53% arena, 24% limo y 23% arcilla), pH de 8.2; contenido medio de materia orgánica (2.8%), rico en nitrógeno total (0.18%), alto contenido de fósforo disponible (29 mg kg<sup>-1</sup>) y alto contenido de potasio intercambiable (4.1 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>).

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L. var. Valenciana) germinaron en charolas de plástico, con arena de río lavada y pasteurizada durante 24 h. El suelo se colocó en vasos de poliestireno con capacidad de 1 kg.

Las cepas microbianas *Pseudomonas aeruginosa* 11PS, *Burkholderia cepacia* P13, *Hafnia alvei* aislamientos S1AS, P25 y P27, y *Enterobacter cloacae* S3DER, así como el inóculo del consorcio *Glomus* spp.

Zac19, se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología de Suelos, Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo. La inoculación de las bacterias y del consorcio de HMA se realizó en el momento del trasplante directamente sobre las raíces de 10 plántulas de alfalfa, de 15 días de edad. Se empleó 1 mL de cultivo bacteriano correspondiente ( $10^9$  células mL<sup>-1</sup>), con ayuda de una pipeta estéril y al mismo tiempo se aplicaron 5 g del consorcio Zac19 ( $7 \pm 1$  esporas y raíces de alfalfa con 67% de colonización total).

Las plantas se cosecharon a los 60 días después del trasplante y la inoculación. Se evaluó el peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz, así como el contenido de N, P y K (Rodríguez, 1993). La colonización del consorcio Zac19 se determinó con la técnica de clareo y tinción de raíces (Phillips y Hayman, 1970), para estimar la frecuencia de la colonización micorrízica (total, arbuscular y vesicular) de acuerdo con el método propuesto por Biermann y Linderman (1981).

Se estableció un experimento factorial  $2 \times 2 \times 7$ , correspondiente a suelo, micorriza y rizobacteria, respectivamente. Los niveles fueron: arenoso y limoso (suelo); con y sin consorcio Zac19 (micorriza); y sin rizobacteria y la inoculación individual de seis rizobacterias. Para el análisis de datos se usó el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso fresco y seco, tanto de la parte aérea como de raíces, no fue significativamente afectado por el factor suelo. Con base en los datos del Cuadro 1, se puede estimar que la materia seca total de las plantas establecidas en suelo limoso, independientemente si se inocularon con las rizobacterias o el consorcio Zac19, presentó un incremento del 6% con respecto a las plantas establecidas en suelo arenoso.

La inoculación de las rizobacterias produjo efectos significativos ( $P \leq 0.01$ ) en el peso fresco y seco de las plantas. De manera particular, las rizobacterias estimularon el crecimiento de las plantas establecidas en el suelo limoso, cuya materia seca total presentó incrementos del 15% con respecto a las plantas que no se inocularon con las rizobacterias. En contraste, a pesar de haber estimulado en un 8% la materia seca total, la inoculación de las rizobacterias en el suelo arenoso

no produjo diferencias significativas con respecto a las plantas sin la inoculación.

El factor más significativo correspondió a la inoculación del consorcio Zac19 en las plantas, las cuales presentaron significativamente mayor peso fresco ( $P \leq 0.01$ ) y seco ( $P \leq 0.05$ ) en especial en suelo limoso (Cuadro 1). Así, con base en el Cuadro 1, se puede estimar que las plantas inoculadas con el consorcio Zac19 en este suelo tuvieron incrementos del 47% en la materia seca total producida con respecto a las plantas sin la inoculación del consorcio. En contraste, el efecto del consorcio Zac19 en las plantas establecidas en el suelo arenoso, no presentó diferencias significativas, a pesar de que las plantas inoculadas con este consorcio tuvieron 48% más materia seca total que las plantas no inoculadas con el consorcio micorrízico.

La interacción consorcio x rizobacterias en suelo limoso tuvo efectos significativos ( $P \leq 0.05$ ), mientras que en el suelo arenoso no se observaron efectos significativos por esta interacción (Cuadro 1). En el caso del suelo limoso, la inoculación combinada del consorcio Zac19 con las bacterias *P. aeruginosa* 11PS, *B. cepacia* P13 y las tres cepas de *Hafnia alvei* (P25, S1AS y P27) produjeron incrementos significativos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) en el peso seco de la parte aérea con respecto a los tratamientos testigo sin bacteria y con aquellos tratamientos en los que sólo se inoculó con las bacterias, excepto con *P. aeruginosa* 11PS (Cuadro 1). Con base en lo anterior, se observó un sinergismo significativo (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) entre el consorcio y las bacterias mencionadas. Lo anterior se denota con mayor claridad, al observar los efectos no significativos de estas bacterias cuando son inoculadas por sí solas, en comparación con el testigo sin la inoculación de bacterias y sin el consorcio (Cuadro 1).

Con respecto al contenido de N, P y K en las plantas de alfalfa, el factor suelo tuvo efectos significativos ( $P \leq 0.01$ ), lo cual pudo estar en relación con las características químicas y la disponibilidad de nutrimentos para las plantas. El suelo limoso contribuyó en mayor contenido foliar de los tres macronutrimentos en comparación con aquellas plantas establecidas en el suelo arenoso (Figura 1). Por su parte, la inoculación de las rizobacterias también produjeron incrementos significativos ( $P \leq 0.01$ ) en el contenido de N, P y K de las plantas, en comparación con las plantas sin inoculación de rizobacterias (Figura 1). No obstante, este beneficio por parte de las rizobacterias fue significativamente

**Cuadro 1. Peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz (expresados en gramos) de alfalfa inoculada con el consorcio micorrízico *Glomus* spp. Zac19 y seis rizobacterias en dos suelos con diferente textura, después de 60 días del trasplante e inoculación.**

Inoculación del consorcio	Inoculación de rizobacterias	Suelo limoso				Suelo arenoso			
		PFPA	PSPA	PFR	PSR	PFPA	PSPA	PFR	PSR
Sin inocular	Testigo	5.90 c	1.00 c	11.00 c	3.10 b	11.00 a	2.00 a	26.00 a	2.90 a
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 11PS	14.10 a	3.50 a	22.00 a	3.00 b	16.80 a	4.00 a	29.00 a	3.00 a
	<i>Hafnia alvei</i> P25	10.00 ab	2.80 b	18.00 b	4.70 a	15.90 a	3.95 a	28.00 a	1.90 a
	<i>Burkholderia cepacia</i> P13	6.00 c	1.90 c	19.00 b	2.00 c	11.00 a	2.80 a	21.00 a	2.00 a
	<i>Hafnia alvei</i> S1AS	11.40 ab	2.90 c	18.00 b	2.60 c	19.00 a	4.00 a	28.00 a	2.80 a
	<i>Hafnia alvei</i> P27	6.10 c	1.60 c	15.00 b	2.40 c	18.00 a	5.01 a	28.00 a	3.40 a
	<i>Enterobacter cloacae</i> S3DER	7.90 c	1.80 c	16.00 b	2.50 c	13.16 a	2.00 a	24.00 a	2.20 a
<i>Glomus</i> spp. Zac 19	Testigo	12.80 ab	2.80 b	26.00 a	4.30 a	14.00 a	3.60 a	26.00 a	3.00 a
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 11PS	17.40 a	4.20 a	26.30 a	5.00 a	16.00 a	3.00 a	25.00 a	3.00 a
	<i>Hafnia alvei</i> P25	14.70 a	4.00 a	23.00 a	4.00 a	18.00 a	4.80 a	30.00 a	2.80 a
	<i>Burkholderia cepacia</i> P13	15.00 a	3.80 a	25.00 a	2.90 bc	13.00 a	3.00 a	25.00 a	2.80 a
	<i>Hafnia alvei</i> S1AS	13.40 ab	3.50 a	21.00 ab	4.10 a	11.40 a	3.00 a	27.00 a	2.70 a
	<i>Hafnia alvei</i> P27	15.20 a	3.65 a	21.00 ab	4.70 a	13.00 a	3.65 a	29.00 a	3.50 a
	<i>Enterobacter cloacae</i> S3DER	12.90 ab	2.80 b	21.00 ab	3.00 b	16.80 a	2.90 a	26.00 a	2.90 a
Significancia:									
Consorcio		0.01	0.01	0.05	0.05	NS	NS	NS	NS
Rizobacteria		0.05	0.05	0.05	NS	NS	NS	NS	NS
Consorcio x Rizobacteria		0.05	0.05	0.01	0.01	NS	NS	NS	NS

Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). PFPA = peso fresco de la parte aérea, PSPA = peso seco de la parte aérea, PFR = peso fresco de la raíz, PSR = peso seco de la raíz. n = 6.

mayor en las plantas establecidas en suelo limoso con respecto a las plantas en suelo arenoso (Figura 1).

De manera similar, la inoculación del consorcio Zac19 estimuló significativamente ( $P \leq 0.001$ ) el contenido de N, P y K en las plantas establecidas en suelo limoso, en 5, 7 y 2 veces más, respectivamente, en comparación con las plantas sin la inoculación de las rizobacterias y sin el consorcio Zac19 (Figura 1A). De igual forma, la inoculación del consorcio micorrízico produjo, en general, concentraciones de N, P y K de hasta dos veces más que las plantas inoculadas con las bacterias por sí solas (Figura 1A). En este mismo suelo limoso, se observó sinergismo entre las rizobacterias y el consorcio Zac19, el cual produjo incrementos significativos en el contenido de N, P y K (Figura 1A).

En contraste, en suelo arenoso, el efecto benéfico del consorcio micorrízico disminuyó, ya que se observaron contenidos de N, P y K en las plantas, prácticamente similares a los obtenidas por la sola inoculación de las rizobacterias, aunque significativamente (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) mayores a aquella obtenida para el testigo sin rizobacterias y sin consorcio Zac19 (Figura 1B).

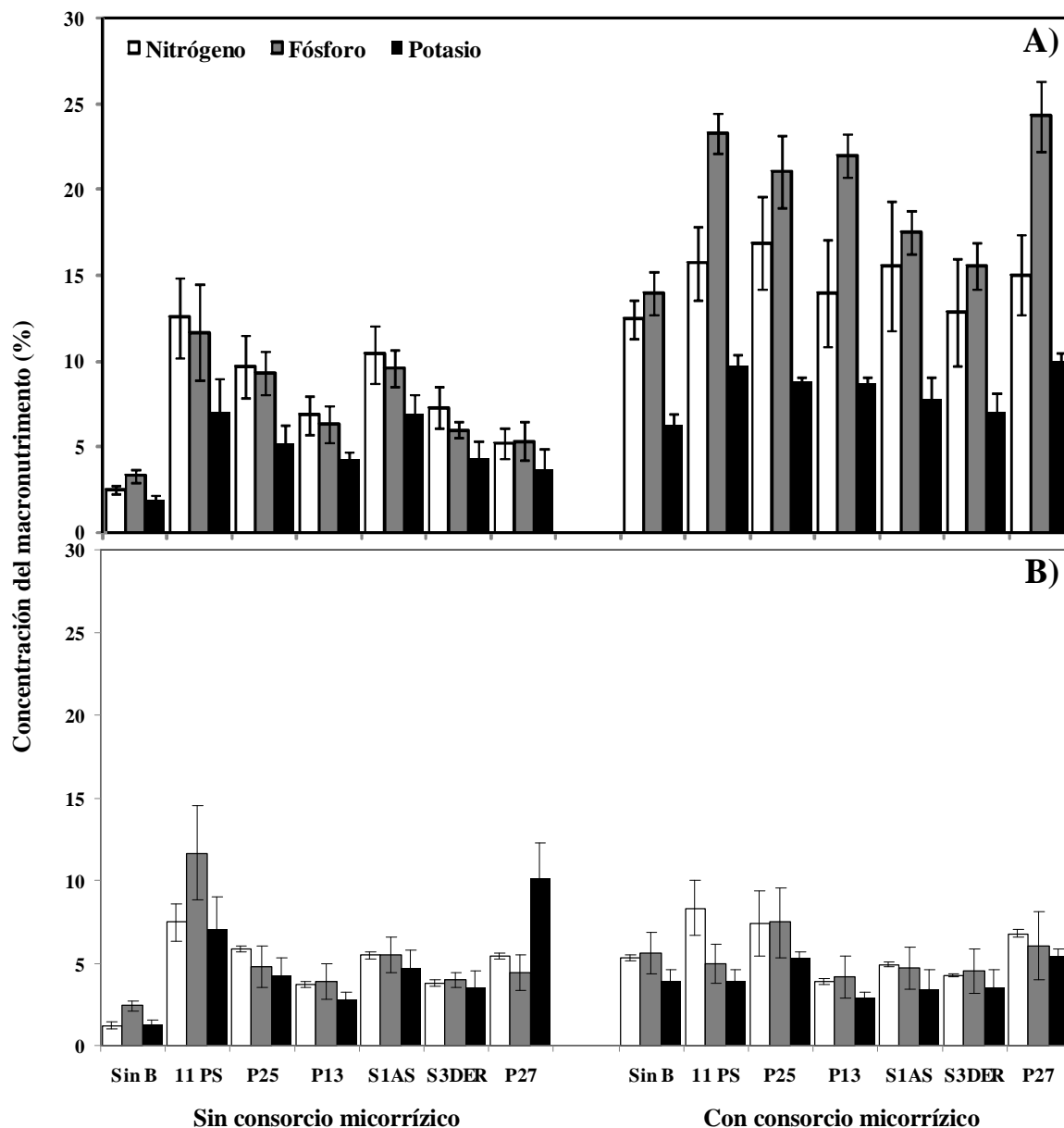
El suelo limoso produjo incrementos significativos en la colonización micorrízica arbuscular (total y arbusculos) en comparación con aquella colonización observada en las plantas establecidas en suelo arenoso (Figura 2). Contrario al sinergismo observado de las rizobacterias y el consorcio Zac19 en la estimulación del peso fresco y seco, y en la nutrición por N, P y K en las plantas establecidas en suelo limoso, con excepción de *P. aeruginosa* 11PS, la inoculación de las rizobacterias resultó en la disminución significativa (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) de la colonización total y de arbusculos en las células corticales de la raíz de alfalfa (Figura 2A). Por su parte, la colonización por vesículas fue estimulada por las rizobacterias 11PS y *H. alvei* P25, en tanto que en las demás rizobacterias, la colonización por estas estructuras fue similar a la de plantas inoculadas únicamente con el consorcio (Figura 2A). En el suelo arenoso, la colonización (total, arbuscular y vesículas) fue significativamente mayor (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) en las plantas con la sola inoculación del consorcio Zac19 (43, 18 y 27%, respectivamente), mientras que en combinación con la cepa 11PS se observó una disminución

de hasta 15, 3 y 2%, respectivamente (Figura 2B). Aún cuando las cepas P25, P13, S1AS, S3DER y P27 estimularon la colonización con respecto a la cepa 11PS, los valores de colonización fueron significativamente menores a las plantas inoculadas únicamente con el consorcio Zac19 (Figura 2B).

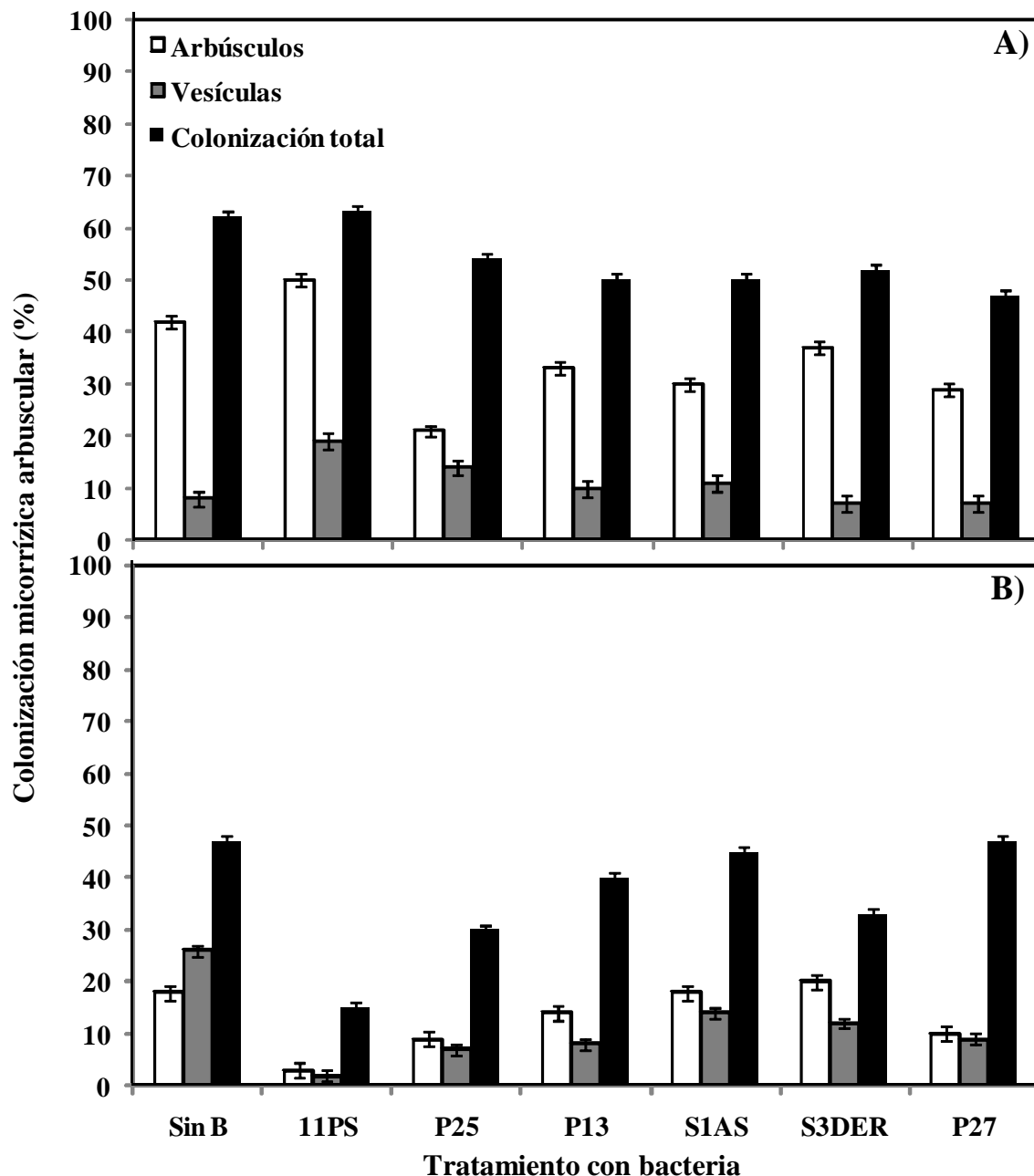
El efecto benéfico de los HMA en el desarrollo, crecimiento y nutrición de las plantas ha sido ampliamente documentado (Rodríguez-Elizalde *et al.*, 2000; Alarcón

*et al.*, 2003; Cartmill *et al.*, 2007). Sin embargo, los estudios en los cuales se ha evaluado el efecto de la coinoculación de HMA con rizobacterias en plantas, han mostrado variabilidad en sus efectos benéficos (Meyer y Linderman, 1986; Velasco *et al.*, 2001; Robles y Barea, 2004).

La simbiosis micorrízica arbuscular ejerce un efecto diferencial en las comunidades microbianas que se desarrollan en la micorrizósfera (definida como la zona



**Figura 1.** Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en plantas de alfalfa por efecto de la inoculación del consorcio micorrízico *Glomus* spp. Zac19 y seis rizobacterias en dos tipos de suelo, después de 60 días del trasplante e inoculación. A) Suelo limoso y B) Suelo arenoso. Simbología: Sin B = sin inoculación de rizobacterias, 11PS = *Pseudomonas aeruginosa*, P13 = *Burkholderia cepacia*, S1AS, P25 y P27 = tres aislamientos de *Hafnia alvei*, y S3DER = *Enterobacter cloacae*. I = Barras de error estándar. n = 3.



**Figura 2. Colonización micorrízica (arbuscular, vesicular y total) en plantas de alfalfa por efecto de la inoculación de seis rizobacterias en dos tipos de suelo, después de 60 días del trasplante e inoculación. A) Suelo limoso y B) Suelo arenoso. Simbología: Sin B = sin inoculación de rizobacterias, 11PS = *Pseudomonas aeruginosa*, P13 = *Burkholderia cepacia*, S1AS, P25 y P27 = tres aislamientos de *Hafnia alvei*, y S3DER = *Enterobacter cloacae*. I = Barras de error estándar. n = 6.**

de suelo con influencia directa de la raíz y de las hifas de los hongos micorrízicos). Así, tanto la secreción de exudados de origen radical como de las hifas de los HMA, produce cambios significativos en la población de grupos fisiológicos de bacterias que pueden estimular el desarrollo y el crecimiento vegetal (Artursson *et al.*, 2006). No obstante, los mecanismos por los cuales

el efecto benéfico de la doble interacción HMA-bacterias en las plantas, aun no han sido clarificados. Linderman (1993) y Bethlenfalvay (1993) indican que la simbiosis micorrízica arbuscular promueve la proliferación de grupos funcionales de bacterias cuya actividad fisiológica se relaciona directamente con la fijación biológica del nitrógeno atmosférico,

solubilización de fosfatos inorgánicos, bacterias productoras de compuestos antibióticos, bacterias y hongos antagonistas a fitopatógenos, bacterias productoras de sideróforos, etc. Todas estas interacciones bacterianas tienen también repercusión en la funcionalidad de los HMA al igual que las propias características del hábitat donde las plantas se están desarrollando, por ejemplo el tipo de suelo (Bethlenfalvay, 1993; Smith y Read, 1997). En este estudio, se observaron diferentes respuestas de las plantas inoculadas con el consorcio Zac19, al combinar de forma individual a las seis bacterias. Mientras que la cepa *P. aeruginosa* 11PS presentó un efecto sinérgico con el consorcio Zac19 al estimular, por ejemplo, el peso seco de la parte aérea y de la raíz en suelo limoso; la combinación del consorcio con *E. cloacae* S3DER no produjo efectos significativos en estas mismas variables (Cuadro 1).

La inoculación de las rizobacterias *P. aeruginosa* 11PS, *E. cloacae* S3DER y *H. alvei* P25 produjo efectos significativos en el crecimiento de las plantas de alfalfa con respecto a las plantas no inoculadas. Estas bacterias se habían probado con éxito como promotoras del crecimiento para lechuga (Díaz *et al.*, 2001), por lo que estas bacterias tienen un rango de hospedantes en los que pueden promover su crecimiento, lo cual se puede relacionar con su actividad fisiológica (Andrade *et al.*, 1997; Loredó-Ostí *et al.*, 2004). Además, Díaz *et al.* (2001) encontraron que *P. aeruginosa* inhibió de manera significativa la germinación de las semillas de lechuga, mientras que esta misma bacteria inoculada en las plántulas pregerminadas promovió su desarrollo y crecimiento. En contraste, Díaz *et al.* (2001) encontraron que *H. alvei* es una rizobacteria promotora de la germinación de semillas de lechuga en más del 36.5%, con respecto al testigo. Lo anterior denota que las bacterias por sí solas tienen efectos diferenciales en las plantas, dependiendo de su estado de desarrollo y que, de esta forma, se justifica la variabilidad del efecto benéfico de las rizobacterias inoculadas en alfalfa.

Por otra parte, el efecto del suelo fue también un factor importante en la expresión de los beneficios de la inoculación, tanto del consorcio Zac19 como de las bacterias y de su combinación, en las plantas de alfalfa. La menor expresión, tanto del crecimiento como del estado nutricional de las plantas establecidas en el suelo arenoso, fue significativamente menor en comparación con el suelo limoso. Lo anterior se puede relacionar

con la fertilidad de ambos suelos, en la que el suelo arenoso presentó mayor pH, mayor contenido de materia orgánica y nitrógeno, y de manera importante mayor contenido de fósforo, con respecto al suelo limoso. Lo anterior pudo haber ejercido un efecto inhibitorio del efecto benéfico, tanto de las bacterias como del consorcio Zac19, mas no en su colonización en la raíz. El efecto negativo del alto contenido de materia orgánica y de la fertilidad de un sustrato en la interacción de los HMA con otros microorganismos ha sido previamente indicado por Smith y Read (1997) y Albertsen *et al.* (2006).

Los resultados demostraron que la efectividad de las especies de los HMA puede ser modificada por las rizobacterias asociadas, denotando respuestas similares al trabajo realizado por Medina *et al.* (2003), al inocular alfalfa con *Glomus deserticola* y *Bacillus pumillus*. Dicho trabajo enfatiza también la estimulación o la reducción del crecimiento de las plantas por la combinación entre HMA y rizobacterias. El presente estudio, además de mostrar efectos de estimulación en el crecimiento y la nutrición de las plantas de alfalfa por la inoculación de las rizobacterias, del consorcio Zac19 y de la combinación de ambos tipos de microorganismos, también reporta la influencia que tiene el tipo de suelo en la efectividad de la inoculación de microorganismos benéficos en la planta de alfalfa. Así, un suelo limoso contribuyó en mayor crecimiento y absorción de nutrimentos a partir de las fuentes nutrimentales disponibles para la planta, por efecto de los microorganismos inoculados, con respecto al suelo arenoso. Lo anterior expone que el tipo de suelo es un factor decisivo para el establecimiento de las plantas, lo cual puede ser mejorado mediante la inoculación de rizobacterias y HMA, como se ha mencionado previamente (Vázquez *et al.*, 2000; Requena *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2003; Robles y Barea, 2004).

## CONCLUSIONES

- La inoculación de alfalfa con el consorcio micorrízico *Glomus* spp. Zacatecas 19 (Zac19) estimuló significativamente el crecimiento y el estado nutricional (nitrógeno, fósforo y potasio) de las plantas de alfalfa, en particular en suelo limoso. Se observó sinergismo entre el consorcio *Glomus* spp. Zac19 y las rizobacterias *Hafnia alvei* aislamientos P25 y P27, con *Pseudomonas aeruginosa* 11PS y con *Enterobacter cloacae* S3DER.

- Las rizobacterias se comportaron de manera diferencial, al inocularse en forma individual o junto con el consorcio Zac19. Existió sinergismo entre *Glomus* spp. Zac19 con *P. aeruginosa* 11PS y *H. alvei* P25, en el contenido de nitrógeno, mientras que la doble inoculación de *Glomus* spp. Zac 19 y las cepas *P. aeruginosa* 11PS, *H. alvei* P25 y P27, y *Burkholderia cepacia* P13, resultó en sinergismo para el contenido de fósforo y potasio.
- El tipo de suelo fue un factor determinante en el comportamiento y la expresión del beneficio hacia la planta, tanto por las rizobacterias como por el consorcio micorrízico arbuscular Zac19.
- Las rizobacterias *P. aeruginosa* 11PS y las cepas *H. alvei* S1AS, P25 y P27 tienen potencial para ser utilizadas como promotoras del crecimiento de plantas de alfalfa.

### LITERATURA CITADA

- Alarcón, A., M. C. González-Chávez y R. Ferrera-Cerrato. 2003. Crecimiento y fisiología de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq en simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares. *Terra* 21: 503-511.
- Albertsen, A., S. Ravnskov, H. Green, D. F. Jensen, and J. Larsen. 2006. Interactions between the external mycelium of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and other soil microorganisms as affected by organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 38: 1008-1014.
- Allen, M. F., W. Swenson, J. I. Querejeta, L. M. Egerton-Warburton, and K. K. Treseder. 2003. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plant and fungi. *An. Rev. Phytopathol.* 41: 271-303.
- Andrade, G., K. L. Mihara, R. G. Linderman, and G. J. Bethlenfalvay. 1997. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 192: 71-79.
- Artursson, V., R. D. Finlay, and J. K. Jansson. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ. Microbiol.* 8: 1-10.
- Bago, B., C. Azcón-Aguilar, Y. Shachar-Hill y P. E. Pfeffer. 2000. El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. pp.78-92. *In:* A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrato (eds.). *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Mundi-Prensa. México, D. F.
- Bethlenfalvay, G. J. 1993. The mycorrhizal plant-soil system in sustainable agriculture. pp. 127-137. *In:* R. Ferrera-Cerrato y R. Quintero-Lizaola (eds.). *Agroecología, sostenibilidad y educación*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Biermann, B. and R. G. Linderman. 1981. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae. A proposed method towards standardization. *New Phytol.* 87: 423-432.
- Cartmill, A. D., A. Alarcón, and L. A. Valdez-Aguilar. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance tolerance of *Rosa multiflora* cv. Burr to bicarbonate in irrigation water. *J. Plant Nutr.* 30: 1517-1540.
- Cartmill, A. D., L. A. Valdez-Aguilar, D. L. Bryan, and A. Alarcón. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance tolerance of vinca to high alkalinity in irrigation water. *Scientia Hort.* 115: 275-284.
- Chamizo, A., R. Ferrera-Cerrato y L. Varela. 1998. Identificación de especies de un consorcio del género *Glomus*. *Rev. Mex. Micol.* 14: 37-40.
- Díaz V., P., R. Ferrera-Cerrato, J. J. Almaraz-Suárez y G. Alcántar. González. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19: 327-335.
- Etchevers B., J. D., W. G. Espinoza y E. Riquelme. 1971. Manual de fertilidad y fertilizantes 2ª ed. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
- Linderman, R. G. 1993. Effects of microbial interactions in the mycorrhizosphere of plant growth and health. pp. 138-152. *In:* R. Ferrera-Cerrato y R. Quintero-Lizaola (eds.). *Agroecología, sostenibilidad y educación*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Loredo-Osti, C., L. López-Reyes y D. Espinosa-Victoria. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Terra Latinoamericana* 22: 225-239.
- Medina, A., A. Probanza, F. J. Gutierrez-Mañero, and R. Azcón. 2003. Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). *Appl. Soil Ecol.* 22: 15-28.
- Meyer, J. R., and R. G. Linderman. 1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 185-190.
- Moreno, D. R. 1978. Clasificación de pH del suelo, contenido de sales y nutrimentos asimilables. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, D. F.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Requena, N., E. Pérez-Solís, C. Azcón-Aguilar, P. Jeffries, and J. M. Barea. 2001. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 495-498.
- Robles, C. y J. M. Barea. 2004. Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *Glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. *Terra Latinoamericana* 22: 59-69.
- Rodríguez, S. J. 1993. La fertilización de los cultivos, un método racional. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Rodríguez-Elizalde, M. A., J. M. Mejía-Muñoz, R. Ferrera-Cerrato, J. Ruiz-Salazar y A. Alarcón. 2000. Micorriza arbuscular, fertilización y vermicomposta en el crecimiento vegetativo de *Gerbera jamesonii*. pp. 170-178. *In:* A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrato (eds.). *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Mundi-Prensa, México, D. F.



- Smith, S. E. and D. J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. San Diego, CA, USA.
- Smith, E., F. A. Smith, and I. Jakobsen. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133: 16-20.
- Soil Survey Staff. 1995. Claves para la taxonomía de suelos, versión 1994. Trad. al español por C. A. Ortiz-Solorio, M. C. Gutiérrez-Castorena y J. L. García R. 1995. Publicación especial 3. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, Estado de México.
- SPAC (Soil and Plant Analysis Council). 1992. Handbook on reference methods for soil analysis. Athens, GA, USA.
- Troe, Z. I. and T. E. Loynachan. 2003. Endomycorrhizal fungal survival in continuous corn, soybean, and fallow. *Agron. J.* 95: 224-230.
- Velasco V., J., R. Ferrera-Cerrato y J. J. Almaraz-Suárez. 2001. Vermicomposta, micorriza arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate de cáscara. *Terra* 19: 241-248.
- Vázquez, M. M., S. César, R. Azcón, and J. M. Barea. 2000. Interactions between mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial populations and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol.* 15: 261-272.