

## Efecto de inoculaciones conjuntas de *Rhizobium*-Micorrizas Arbusculares en *Leucaena leucocephala* CV: Perú Effect of combined inoculations of *Rhizobium*-Arbuscular Mycorrhiza in *Leucaena leucocephala* CV: Perú

Lázaro Jesús Ojeda Quintana<sup>1</sup>, Ricardo Herrera Peraza<sup>2</sup>, Eduardo Furrázola Gómez<sup>2</sup> y Consuelo Hernández Rodríguez<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CUM Cumanayagua, Universidad de Cienfuegos “Carlos R. Rodríguez”. Cumanayagua, Cienfuegos, Cuba

<sup>2</sup> Instituto de Ecología y Sistemática. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, La Habana, Cuba

<sup>3</sup> Estación Experimental de Suelos y Fertilizantes “Escambray”. Barajagua, Cumanayagua, Cienfuegos, Cuba

E-mail: joberverde@azurina.cult.cu; ljojeda@ucf.edu.cu

**RESUMEN.** El trabajo se desarrolló en la Estación Experimental de Suelos y Fertilizantes “Escambray” y en terrenos de agricultores vinculados a la extensión rural. El diseño experimental utilizado fue de bloques al azar, y los tratamientos: *Rizhobium loti* V-4033 (Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes), Hongos Formadores de Micorriza, *Rhizobium* + Hongos Formadores de la Micorriza, Nitrógeno y un control absoluto. La inoculación con hongos formadores de la micorriza se realizó a 10 g/bolsa de MicoFert Certificado de la Cepa del Instituto de Ecología y Sistemática-3: *Glomus spurcum*, Topes de Collantes, con un 85 % de colonización de raicillas, mientras que el *Rhizobium* se inoculó en la dosis de 50 g/kg de semilla. La variante nitrogenada fue a 25 kg/ha de urea. Las parcelas ocuparon 18 m<sup>2</sup>, con un área evaluable de 9 m<sup>2</sup>. Cuando las plantas alcanzaron 7,5 meses y una altura promedio de 143,4 cm se procedió a realizar el Corte de establecimiento y luego se hicieron cuatro cortes de follajes cada 90 días. En cada corte se determinó el rendimiento de biomasa seca, contenido de fósforo y proteína bruta. Las inoculaciones conjuntas de *Rhizobium* y Hongos Formadores de la Micorriza incrementaron el rendimiento de biomasa seca, contenido de fósforo y de proteína bruta. Se concluye proponer la adopción de una metodología alternativa con el uso de Hongos Formadores de la Micorriza y *Rhizobium* en *Leucaena leucocephala* como forma de incrementar el rendimiento de biomasa seca, disminuir la fertilización mineral y contribuir a la protección del medio ambiente.

**Palabras clave:** *inoculación*, *Leucaena leucocephala*, *micorriza arbuscular*, *Rhizobium*.

**ABSTRACT.** The work was conducted at the Experimental Station of Soil and Fertilizer “Escambray” land of farmers and associated rural extension. The experimental design was randomized blocks, and treatments: *Rizhobium loti* V-4033 (Research Institute of Pastures and Forages), mycorrhizal fungi trainers, *Rhizobium* + mycorrhiza fungi trainers, nitrogen and total control. Inoculation with mycorrhiza forming fungi was performed at 10 g/bag Certificate MicoFert Strain the Institute of Ecology and Systematics-3: *Glomus spurcum*, Topes de Collantes, 85 % colonization of rootlets, while the *Rhizobium* was inoculated in a dose of 50 g/kg of seed. Variant was nitrogen at 25 kg/ha of urea. The plots occupied 18 m<sup>2</sup>, with an area of 9 m<sup>2</sup> evaluable. When the plants reached 7.5 months and an average height of 143.4 cm proceeded to make the Court of establishment and then four foliage cuts were made every 90 days. Each cut dry biomass yield, and phosphorus content was determined crude protein. The combined inoculation of *Rhizobium* and mycorrhiza fungi Makers increased the yield of dry biomass, and phosphorus content of crude protein. We conclude proposing the adoption of an alternative methodology using mycorrhiza formers Fungi and *Rhizobium* in *Leucaena leucocephala* as a way to increase the yield of dry biomass, decreasing mineral fertilization and contribute to environmental protection.

**Key words:** *inoculation*, *Leucaena leucocephala*, *Arbuscular mycorrhiza*, *Rhizobium*.

## INTRODUCCIÓN

La producción ganadera en Cuba ocupa más de 2 millones de ha pero el 91 % de las mismas presenta factores limitantes, por lo que su potencial de producción natural no permite mantener una Unidad

de Ganado Mayor por ha/año. Para producir leche y carne en estas áreas fue necesario transformar las sabanas, utilizar fertilizantes, irrigación, suplementos y alimentos concentrados, elevar la calidad de los

sistemas de manejo y mejorar la política racial vacuna. Esta estrategia permitió obtener más de 900 y 300 mil t/año de leche y carne en la década de los ochenta, sucediéndose un declive a partir del endurecimiento del período especial en 1992, que en la última mitad del siglo pasado e inicios del presente indican una recuperación paulatina.

Una alternativa viable para mejorar el déficit alimentario de la ganadería lo constituye la introducción de leguminosas, la cual se ha incrementado hasta convertirse en una de las más impulsadas para rescatar las producciones ganaderas del país, debido fundamentalmente a la ventaja biológica que implica en la nutrición del rumiante el aporte proteico, ya sea en cultivos puros, bancos de proteína, áreas forrajeras o intercalamiento en cuarterones de gramíneas.

Es un hecho universalmente aceptado que los Hongos Formadores de la Micorriza (HFM) estimulan el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, especialmente en suelos de baja y moderada fertilidad; la micorriza beneficia substancialmente la absorción de nutrientes, especialmente de P y de agua por la

planta. Se debe tener presente que el P, a diferencia del N, 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, 2000)

En muchas áreas, especialmente en las regiones tropicales, áridas y semiáridas, la producción animal está limitada por una 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 y col., 2000)

El presente trabajo tiene como objetivo, evaluar el efecto de la inoculación de HFM y de *Rhizobium* en *Leucaena leucocephala* vc. Perú, leguminosa forrajera regionalizada a condiciones de bajos insumos en un suelo Pardo Grisáceo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se condujo durante dos años en condiciones de campo, con un diseño de bloques al azar, tres repeticiones y los siguientes tratamientos:

- 1) *Rhizobium loti* V-4033\*.
- 2) HFM, IES-3. *Glomus spurgum*. \*\*
- 3) *Rhizobium* + HFM.
- 4) Nitrógeno, 25 kg ha<sup>-1</sup>
- 5) Control.

\* Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes. MINAG.

\*\* Instituto de Ecología y Sistemática. CITMA.

La inoculación con HFM se realizó a razón de 10 g bolsa<sup>-1</sup> de MicoFert Certificado, cepa IES-3: *Glomus spurgum*, Topes de Collantes, con un 85 % de colonización de las raicillas, mientras que el *Rhizobium* fue aplicado en dosis de 50 g kg<sup>-1</sup> de semilla. La variante nitrogenada fue de 25 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno (1255 mg por bolsa)

Las parcelas fueron de 18 m<sup>2</sup> con un área evaluable de 9 m<sup>2</sup>. Cuando las plantas alcanzaron 7,5 meses y una altura promedio de 143,4 cm se efectuó el corte de establecimiento y luego se hicieron cuatro cortes de follaje cada 90 días. En cada uno de los cortes se tomaron muestras foliares para determinar el rendimiento de biomasa seca, contenido de fósforo (digestión con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + Se, y determinación colorimétrica con el sistema del molibdo-vanadato) y proteína bruta a partir del cálculo del nitrógeno por digestión con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + Se y determinación colorimétrica con el reactivo de Nessler, posteriormente se multiplicó el valor por 6,25 respectivamente. (Ríos y col., 1982)

El trabajo se desarrolló en un suelo Pardo Grisáceo (Hernández, 1999) con los siguientes componentes de fertilidad: pH (KCI): 4,43 (método potenciométrico. NC 10390/1999), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 3,14 mg/100 g<sup>-1</sup> (método colorimétrico de Oniani, NC-52/

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento de biomasa seca se aprecia en la tabla 1. Las variantes inoculadas superaron al control, tanto con *Rhizobium* como con HFM o combinados, al presentar un comportamiento similar por épocas del año y acumulado. La aplicación de HFM + *Rhizobium* superó estadísticamente a las

aplicaciones independientes, y alcanzaron un un 30,7% de incremento con relación al control. Cuando se aplicó micorriza, incrementamos el rendimiento en un 17,3 %, mientras que con *Rhizobium* un 11,5 %. El tratamiento con nitrógeno logró los mayores rendimientos, con diferencias significativas de las demás variantes al superar el control en un 53,8 %.

**Tabla 1. Efecto de la inoculación con HFM en el rendimiento de biomasa de *Leucaena leucocephala* vc. Perú**

Tratamientos	Período poco lluvioso	Período lluvioso	Total	Incremento (%)
<i>Rhizobium loti</i> V-4033	2,4 c	3,4 c	5,8 c	11,5
<i>Glomus spurgum</i> . IES-3	2,7 bc	3,4 c	6,1 c	17,3
<i>Rhizobium</i> + HFM	2,8 b	4,0 b	6,8 b	30,7
Nitrógeno	4,0 a	4,0 a	8,0 a	53,8
Control	2,0 d	3,2 d	5,2 d	-
ES ±	0,0525 **	0,0779 **	0,0108 **	

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 y Read, 2008). Ellos han sido utilizados en la agricultura, como bioinoculantes ya que favorecen la absorción de nutrimentos esenciales como el fósforo, el nitrógeno y agua, incrementan los rendimientos, además brindan protección a la planta contra organismos patógenos.

Méndez (2005) indica que las bacterias del género *Rhizobium* son Gram negativas y aerobias obligadas que pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*. Entre ellos se encuentran los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizbium* 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.

Los resultados del rendimiento demostraron un sinergismo entre estos microorganismos de acuerdo con la respuesta a la inoculación presentada en las condiciones de suelo medianamente ácido en que se condujo el experimento, e indicaron el amplio potencial de las leguminosas debido a su capacidad de doble asociación con bacterias del género *Rhizobium* y los HFM, que se consideran un simbiote muy eficaz, a partir de la posibilidad de ampliar las

raíces y proveer a las mismas de un nicho protector. (Corredor, 2008)

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. Por lo que al tener en cuenta que nos encontramos en un suelo bajo en fósforo donde no se aplicó ningún fertilizante mineral, los resultados obtenidos de incremento en el rendimiento, indican la factibilidad de poder utilizar la doble asociación de estos microorganismos.

El contenido de fósforo y la proteína bruta en planta se observa en la tabla 2, donde se aprecia como el fósforo de manera general, fue mayor en las variantes inoculadas en relación al control, y dentro de éstas, existió una tendencia superior en la inoculación con HFM seguida por la combinación de ambos microorganismos y por el *Rhizobium*. La doble inoculación superó a la variante nitrogenada de manera absoluta. Dicho comportamiento parece justificable, si se tiene en cuenta que las micorrizas absorben el fósforo desde niveles profundos del suelo mediante su red de hifas, mientras que el *Rhizobium* requiere una demanda alta de este elemento para la fijación biológica del nitrógeno, por tanto es muy necesaria la combinación de ambos.

**Tabla 2. Contenido de fósforo y proteína bruta en *Leucaena leucocéphala* vc. Perú**

Tratamientos	Período poco lluvioso		Período lluvioso		$\bar{X}$		Incremento (%)	
	% P	% PB	% P	% PB	% P	% PB	% P	% PB
<i>Rizhobium loti</i> V-4033	0,19 c	25,1 b	0,25 c	32,4 b	0,22	28,7	-	15,2
<i>Glomus spurcum</i> . IES-3	0,20 b	23,8 c	0,27 b	29,6 c	0,23	26,7	4,5	7,2
<i>Rhizobium</i> + HFM	0,21 a	27,3 b	0,29 a	33,2 b	0,25	30,2	13,6	21,2
Nitrógeno	0,23 cd	29,6 a	0,30 cd	34,9 a	0,26	32,2	18,1	29,3
Control	0,20 d	23,2 d	0,24 d	26,7 d	0,22	24,9	-	-
ES $\pm$	0,0048 **	0,4431 **	0,0081**	0,3423 **				

En estudios realizados por Ávila y col, 2003 en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spiritus, se determinó el efecto de las cepas de *Bradyrhizobium* y micorrizas vesículo arbusculares en la producción de semillas de kudzú (*Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth.). Los resultados mostraron un efecto positivo en la producción de semillas cuando las plantas fueron inoculadas con *Bradyrhizobium* más micorrizas vesículo-arbusculares (633 y 682 kg/ha para el primer y segundo año, respectivamente), la cual difirió significativamente del control. La dependencia a estos microorganismos fue notable y el porcentaje de germinación fue superior (84%) cuando fue coinoculada.

La aplicación de inóculos de HMA en leguminosas ha registrado además del incremento del contenido de fósforo, la presencia de otros nutrimentos, como el nitrógeno, calcio, boro, los que son captados del suelo por 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 y establecer mecanismos de sinergia a nivel biológico que repercuten en las plantas hospederas. (Talbot y Treseder, 2010)

La inoculación de *Rhizobium* solo, HFM y HFM+*Rhizobium* superaron significativamente al control ( $p < 0.05$ ) en 15,2, 7,2 y 21,2 % de proteína bruta respectivamente. La variante nitrógeno

alcanzó el mayor valor con relación al resto de los tratamientos. Estos resultados corroboran una vez más el efecto favorable de la doble simbiosis por su sinergismo. De igual forma, se aprecia la eficiencia de los dos microorganismos al ser inoculados por separados.

El *Rhizobium* se encuentra de forma natural en los suelos, aunque diversos estudios indican que su efectividad puede disminuir en la medida que los suelos tengan mayor contenido de la materia orgánica y donde exista una alta actividad biológica; no obstante juega un papel importante en la transición hacia una agricultura ecológica cuando partimos de suelos con bajos niveles de la materia orgánica y muy deteriorados biológicamente por el uso de agrotóxicos, como es el caso del suelo Pardo Grisáceo que ocupa la investigación (bajo en Materia Orgánica, fósforo y con una larga tradición en el uso de fertilizantes minerales)

Morales (2008) refiere que el principal efecto de la micorrización en la planta hospedera, se debe a la posibilidad de incrementar el área superficial subterránea combinada (raíces y micorrizas) al mejorar la adquisición de nutrientes, lo que se favorece aún más en las leguminosas, al tener raíces y pelos radicales cortos. En varias leguminosas esta relación inversa es también indicada en el número de nódulos, pudiendo tener repercusión en el contenido de proteína bruta que la misma alcanza en las variantes inoculadas.

## CONCLUSIONES

La inoculación conjunta de hongos formadores de la micorriza y *Rhizobium* incrementan el rendimiento de materia seca, el contenido de fósforo foliar y la proteína bruta en relación al

tratamiento control en un 30 y 22 % respectivamente, lo que indica la posibilidad de su utilización como alternativas para la biofertilización de esta leguminosa forrajera.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ávila, U.; M.E. Hernández; I. Pasarón: Efecto de *Bradyrhizobium* sp. y micorrizas vesículo-arbusculares en la producción de semillas de *Pueraria phaseoloides*. *Pastos y Forrajes* 26 (4):303, 2003.
2. Coyne, R.: Micorrizas. En: *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid, 2000, 416 p. ISBN: 84-283-2648-7.
3. Corredor, Gloria A.: Micorrizas arbusculares: Aplicación para el manejo sostenible de los agroecosistemas 2008. <http://www.turipana.org.co/Micorrizas.html>. Consultado el 06 de febrero 2014.
4. Duncan, D.B.: Multiple range and multiple F test. *Biom.* 11:1-42, 1955.
5. Hernández, A.; J. M. Pérez Jiménez; D. Borroto: Nueva versión de la Clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. MINAGRI, Cuba, 1999, 45 p.
6. Méndez, F.: Efectos de bacteria tipo rhizobium en jitomate saladette. 2005. En sitio web: <http://es.scribd.com/doc/16231558/Efectos-de-Bacteria-Tipo-Rhizobium-en-Jitomate-Saladette>. Consultado el 06 de febrero, 2014.
7. Marulanda-Aguirre, A., R. Azcón, J.M. Ruiz-Lozano y R. Aroca. Differential Effects of a *Bacillus megaterium* Strain on *Lactuca sativa* Plant Growth Depending on the Origin of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Coinoculated: Physiologic and Biochemical Traits. *J Plant Growth Regul* 27:10–18, 2008. DOI 10.1007/s00344-007-9024-5.
8. Normas Cubanas 51 (Oficina Nacional Normalización, N.C. 51/1999): Calidad del suelo. Análisis Químico. Determinación del % de Materia Orgánica. Cuba, 1999.
9. Norma Cubana 52 (N.C. 52/1999): Calidad del suelo. Determinación de las formas móviles de potasio y fósforo. Cuba, 1999.
10. Norma cubana (N.C.10390:1999): Determinación de pH por el método Electrométrico, Vigente desde 87-6, pp 4.
11. Ríos. C.; P. Muñoz; M. Zaldivar; T. Rukis: Métodos para realizar el análisis zootécnico de los alimentos en los laboratorios agroquímicos. Estación Experimental “Escambray”. Instituto de Investigaciones de Suelos y Agroquímica. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana. Cuba, 1982, 33 p.
12. Richardson, A.E.; J.M. Barea; A.M. McNeill; C. Prigent-Combaret: Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305-339, 2009.
13. Stamford, N.; F. Araújo; N. Silva: 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, 2000.
14. Smith S. E.; D.J. Read: *Mycorrhizal Symbiosis*, Academic Press, London, England. 2008, 800 p. ISBN: 9780080559346
15. Talbot, J.M., Treseder, K.K.: Controls over mycorrhizal uptake of organic nitrogen. *Pedobiologia* 53(3): 169–179, 2010.

Recibido:21/02 /2014

Aceptado:21/07/2014