

# CRECIMIENTO DE *Tabebuia donnell-smithii* Rose INOCULADA CON HONGOS MICORRÍZICOS Y *Azospirillum brasilense*

## *Tabebuia donnell-smithii* Rose GROWTH INOCULATED WITH MYCORRHIZAL FUNGI AND *Azospirillum brasilense*

Juan F. Aguirre-Medina<sup>1</sup>, Fernando Culebro-Cifuentes<sup>1</sup>, Jorge Cadena-Iñiguez<sup>2\*</sup>, Juan F. Aguirre-Cadena<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Entronque carretera costera y Estación Huehuetán. 30660. Huehuetan, Chiapas, México. (juanf56@prodigy.net.mx);

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados. km 36.5 carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo Estado de México. México. (jocadena@colpos.mx), (juaguirre86@hotmail.com).

### RESUMEN

La explotación forestal sin regulación en bosques tropicales promueve la invasión de vegetación secundaria que compite con especies de mediano y lento crecimiento, limitando su regeneración natural. Muchos esfuerzos de reforestación fracasan por esta situación poniendo en riesgo el equilibrio del ecosistema por diferencias en densidad y distribución de especies. Con el fin de promover un mayor crecimiento en menor tiempo de la especie maderable primavera (*Tabebuia donnell-smithii* Rose) en condiciones de vivero, se evaluó el efecto de la inoculación con *Rhizophagus intraradices* (Schenck et Sm.) Walker et Schuessler, *Glomus* spp., y *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner. El vivero se estableció con semillas recolectadas en el Soconusco, Chiapas, México, en bolsas de plástico de 5 kg con una mezcla de suelo andosol-mólico y arena de río lavada (1:1) con 2 g de inoculante al momento del trasplante. *Azospirillum brasilense* tuvo una concentración de  $9 \times 10^6$  bacterias  $g^{-1}$  y *R. intraradices* 40 esporas  $g^{-1}$  de suelo con 95 % de colonización al sistema radical. El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron los microorganismos individuales, combinados y un testigo, con cuatro repeticiones. Las variables morfológicas y fisiológicas del rendimiento, porcentaje de colonización radical micorrízica se registraron cada 28 d desde los 56 d hasta 168 d después de siembra. Las plantas con *R. intraradices*, la simbiosis doble *A. brasilense*+*R. intraradices* y *Glomus* sp. (V) presentaron mayor aumento de biomasa a 112 d ( $p \leq 0.05$ ), mientras que el mayor contenido de nitrógeno se encontró en raíces de plantas inoculadas con *R. intraradices* y en el vástago con *A. brasilense*. El contenido de fósforo fue mayor con *R. intraradices* y *A. brasilense* en el vástago. Las diferencias significativas finales en altura de

### ABSTRACT

Unregulated logging in tropical forests promotes invasion of secondary vegetation that compete with species of medium and slow growth, limiting their natural regeneration. Many reforestation efforts fail for this situation endangering the ecosystem balance by differences in density and distribution of species. In order to promote a greater growth in shorter time of the timber species (*Tabebuia donnell-smithii* Rose) primavera under nursery conditions, the effect of inoculation with *Rhizophagus intraradices* (Schenck et Sm.) Walker et Schuessler, *Glomus* spp., and *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner was evaluated. Nursery was established with seeds collected in the Soconusco, Chiapas, Mexico, in plastic bags of 5 kg with a mixture of Andosol-mollic soil and river sand washed (1:1) with 2 g of inoculant at the time of transplantation. *Azospirillum brasilense* had a concentration of  $9 \times 10^6$  bacteria  $g^{-1}$  and *R. intraradices* 40 spores  $g^{-1}$  of soil with 95 % of colonization to the root system. The experimental design was completely randomized treatments were individual, combined microorganisms, and a control with four replications. Morphological and physiological variables of yield, percentage of mycorrhizal root colonization were recorded every 28 d from the 56 d to 168 d after sowing. Plants with *R. intraradices*, double symbiosis *A. brasilense*+*R. intraradices* and *Glomus* sp. (V) showed higher increase of biomass at 112 d ( $p \leq 0.05$ ), whereas the highest nitrogen content was found in roots of plants inoculated with *R. intraradices* and in the shoot with *A. brasilense*. The phosphorus content was higher with *A. brasilense* and *R. intraradices* on the shoot. The final significant differences in plant height were 6 to 8 cm among inoculated treatments and of 16 cm of these with respect to the control.

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2013. Aprobado: marzo, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 48: 331-345. 2014.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, biofertilization, *Rhizophagus intraradices*, *Glomus*, nitrogen and phosphorus.

planta fueron de 6 a 8 cm entre tratamientos inoculados y de 16 cm de éstos respecto al testigo.

**Palabras clave:** *Azospirillum brasilense*, biofertilización, *Rhizophagus intraradices*, *Glomus*, nitrógeno y fósforo.

## INTRODUCCION

**T***abebuia donnell-smithii* Rose, o primavera, es un árbol caducifolio de regiones tropicales y subtropicales de México (Miranda, 1976; Rzedowski, 1978; Grose y Olmstead, 2007), Guatemala, El Salvador y norte y centro de Honduras (Cordero *et al.*, 2003). Este árbol crece en pendientes elevadas entre 150 y 800 m de altitud en bosques dominados por *Terminalia oblonga* A. (Ruiz & Pav.) Steud., y *Virola guatemalensis* (Hemsl.) Warb, así como en bosques subdeciduos en terrazas aluviales y pendientes coluviales (Cordero *et al.*, 2003). Su madera es muy demandada como materia prima para muebles y acabados (Dirzo y García, 1992) y la primavera es atractiva para la reforestación urbana por sus flores amarillas. Esta especie es de lento crecimiento y tasa baja de repoblación natural; para atenuar esa limitante se reproduce en vivero para su inclusión en programas de reforestación y agroforestales. Su crecimiento en vivero se puede aumentar y reducir el tiempo de traslado al campo mediante la aplicación de biofertilizantes a la semilla, los cuales son productos a base de uno o más microorganismos no patógenos que al ser inoculados pueden vivir asociados o en simbiosis con la planta, aumentando el suministro, disponibilidad y acceso físico de nutrientes que favorecen mayor crecimiento (Barea *et al.*, 2002).

Los biofertilizantes a base de hongos endomicorrizicos y de bacterias fijadoras de nitrógeno favorecen el desarrollo vegetal y reproductivo de maíz (*Zea mays* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), soya (*Glycine max* (L.) Merr.), trigo (*Triticum aestivum* L.), sorgo (*Sorghum* spp. (L.) Moench), avena (*Avena sativa* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) en producción comercial, y hay mayor concentración de nitrógeno y fósforo en toda la planta (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011). La aplicación de hongos micorrizicos aumenta la biomasa en cultivos perennes como *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit, (Ruiz-Torres *et al.*, 2005), cacao (*Theobroma cacao* L.) (Aguirre-Medina *et al.*, 2007) y varios cítricos

## INTRODUCTION

**T***abebuia donnell-smithii* Rose, or primavera, is a deciduous tree of tropical and subtropical regions of Mexico (Miranda, 1976; Rzedowski, 1978; Grose and Olmstead, 2007), Guatemala, El Salvador and northern and central Honduras (Cordero *et al.*, 2003). This tree grows on steep slopes between 150 and 800 m of altitude dominated by *Terminalia oblonga* A. (Ruiz & Pav.) Steud., and *Virola guatemalensis* (Hemsl.) Warb as well as in sub-deciduous forests on alluvial terraces and colluvial slopes (Cordero *et al.*, 2003). Its wood is in high demand as a raw material for furniture and finishes (Dirzo and Garcia, 1992) and primavera is attractive for urban reforestation; by its yellow flowers. This species has slow growth and low rate of natural reforestation; to mitigate this limitation it is reproduced in the nursery to be included in reforestation and agroforestry programs. Its growth in the nursery can be increased and the transfer time to the field decreased through the application of bio-fertilizers to the seed, which are products made of one or more non-pathogenic microorganisms that when inoculated can live associated or in symbiosis with the plant, increasing the supply, availability and physical access of nutrients that promote higher growth (Barea *et al.*, 2002).

Bio-fertilizers based on endomycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria favor the vegetative and reproductive growth of maize (*Zea mays* L.), bean (*Phaseolus vulgaris* L.), soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), wheat (*Triticum aestivum* L.), sorghum (*Sorghum* spp. (L.) Moench), oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) in commercial production, and there is a higher concentration of nitrogen and phosphorus in the whole plant (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011). The application of mycorrhizal fungi increases biomass in perennial crops such as *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit, (Ruiz-Torres *et al.* 2005), cocoa (*Theobroma cacao* L.) (Aguirre-Medina *et al.*, 2007) and several citrus (Irizar-Garza *et al.*, 2003). Besides, growth is increased with application of *Azospirillum* spp., in *Theobroma cacao* L. and *Coffea arabica* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011; Sánchez *et al.*, 2005) and inoculation with mycorrhizal fungi improves survival under adverse environmental conditions (Andrade *et al.*, 2009), because when inoculating

(Irizar-Garza *et al.*, 2003). Además el crecimiento aumenta al aplicar *Azospirillum* spp., en *Theobroma cacao* L. y *Coffea arabica* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011; Sánchez *et al.*, 2005), y la inoculación con hongos micorrízicos mejora la supervivencia en condiciones ambientales adversas (Andrade *et al.*, 2009), porque al inocular los microorganismos en la semilla se induce simbiosis, y hay beneficios nutrimentales a la planta sobre todo en la etapa inicial de crecimiento (Barea *et al.*, 2002). Con base en lo anterior, el objetivo de estudio fue evaluar el efecto de *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense*, *Glomus* sp. (T) y *Glomus* sp. (V) en la altura, el número de hojas, el diámetro del tallo y la biomasa de *Tabebuia donnell-smithii* Rose bajo condiciones de vivero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio experimental, suelo y material biológico

La investigación se realizó durante el verano de 2010 en un vivero en el Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Km 18 Carretera Tapachula-Cacahatán, Municipio de Tuxtla Chico, Chiapas, (14° 58' 28.89" N y 92° 09' 19.64" O), a 435 m de altitud, temperatura media máxima de 34 °C, y mínima 17 °C. El suelo andosol-mólico, con textura areno-migajosa (Bouyucos), 82.5 % arena, 12.3 % limo, 5.2 % arcilla, 3.1 % materia orgánica (Walkley-Black), 0.12 ds m<sup>-1</sup> conductividad eléctrica, pH 5.21, 0.12 % N (Kjeldhal), 4.0 ppm P (colorimetría), 18.5 ppm K<sup>++</sup> (espectrofotometría atómica), 59 ppm Ca<sup>++</sup> (espectrofotometría atómica), 9.1 ppm Mg<sup>++</sup>, 16.8 ppm Na<sup>++</sup>, y 5 Meq·100 g<sup>-1</sup> de capacidad de intercambio catiónico.

Con muestras de este suelo sin esterilizar se llenaron bolsas de plástico negro (calibre 700) de 5 kg, perforadas en la parte inferior para drenaje y colocadas sobre bancales de fierro. En este experimento se usó *R. intraradices* y hongos endomicorrízicos del género *Glomus* spp., uno aislado de raíces de té limón (T) (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) y otro de vetiver (V) (*Vetiveria zizanioides* (L.) Roberty), los cuales fueron propagados en suelo estéril usando plantas de cebolla (*Allium cepa* L.) como hospedera. Al momento del envasado había 40 esporas g<sup>-1</sup> de suelo y el nivel de colonización en el sistema radical fue 95 %. El inóculo con *A. brasilense* fue elaborado con 9×10<sup>6</sup> células g<sup>-1</sup> de turba y fue proporcionado por el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Benemérita

microorganismos in the seed symbiosis is induced, and there are nutrient benefits to the plant especially at the initial stage of growth (Barea *et al.*, 2002). Based on the above, the objective of this study was to evaluate the effect of *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense*, *Glomus* sp. (T) and *Glomus* sp. (V) on height, number of leaves, stem diameter and biomass of *Tabebuia donnell-smithii* Rose under nursery conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental site, soil and biological material

The research was carried out during the summer of 2010 in a nursery at the Experimental station Rosario Izapa of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Km 18 of the Road Tapachula-Cacahatán, Municipality of Tuxtla Chico, Chiapas, Mexico, (14° 58' 28.89" N and 92° 09' 19.64" W), at 435 masl, average minimum and maximum temperature 17 °C and 34 °C, respectively. Soil is Andosol-mollic, with sandy-crumbly texture (Bouyucos), 82.5 % sand, 12.3 % silt, 5.2 % clay, 3.1 % organic matter (Walkley-Black), 0.12 ds m<sup>-1</sup> electric conductivity, pH 5.21, 0.12 % N (Kjeldahl), 4.0 ppm P (colorimetry), 18.5 ppm K<sup>++</sup> (atomic spectrophotometry), 59 ppm Ca<sup>++</sup> (atomic spectrophotometry), 9.1 ppm Mg<sup>++</sup>, 16.8 ppm Na<sup>++</sup>, and 5 Meq·100 g<sup>-1</sup> cation exchange capacity.

With samples of this unsterilized soil, black plastic bags (700 gauge) of 5 kg were filled, boring the bottom for drainage and placing them on iron banks. In this experiment, *R. intraradices* and endomycorrhizal fungi of the genus *Glomus* spp. were used; one isolated from roots of lemongrass (T) (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) and the other of vetiver (V) (*Vetiveria zizanioides* (L.) Roberty) which were propagated in sterile soil using onion (*Allium cepa* L.) plants as host. At the time of packaging there were 40 spores g<sup>-1</sup> of soil and the level of colonization in the root system was 95 %. The inoculum with *A. brasilense* was prepared with 9×10<sup>6</sup> cells g<sup>-1</sup> of peat and was provided by the Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. The seeds of *Tabebuia donnell-smithii* Rose were obtained from two trees in the Soconusco region, Chiapas, by collecting ripe pods before dehiscence. The seed germinated in trays with sterile peat, and 15 d after the seedlings were transplanted to pots when they had four true leaves. Treatments with endomycorrhizal fungi and bacterium *A. brasilense* were applied in 2 g of the inoculum deposited in the pot of transplantation. The treatments were seven: *A. brasilense*;

Universidad Autónoma de Puebla. Las semillas de *Tabebuia donnell-smithii* Rose se obtuvieron de dos árboles en la región del Soconusco, Chiapas, recolectando vainas maduras antes de su dehiscencia. Las semillas germinaron en charolas con turba estéril, y 15 d después las plántulas fueron trasplantadas a las macetas cuando tenían cuatro hojas verdaderas. Los tratamientos con hongos endomicorrízicos y la bacteria *A. brasilense* se aplicaron en 2 g del inóculo depositado en la maceta al trasplante. Los tratamientos fueron siete: *A. brasilense*; *R. intraradices*; *Azospirillum*+*Rhizophagus*; Testigo (sin microorganismos); *Glomus* sp. (T; aislada de Té limón); *Glomus* sp. (V; aislada de vetiver); *Glomus* sp. (T) + *Glomus* sp. (V), con cuatro repeticiones en un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue una maceta con una planta. Los muestreos destructivos se realizaron a los 56, 84, 112, 140 y 168 d después de la siembra, y los riegos se hicieron con agua destilada.

### Variables

#### Altura, número de hojas, diámetro del tallo y biomasa

La altura se registró desde el cuello de la raíz hasta la yema apical cada 28 d. El número de hojas totales por planta se cuantificó en cada muestreo, tratamiento y repetición. El diámetro del tallo se registró con un vernier digital a una altura de 0.5 cm de distancia de la corona radical hacia el ápice de la planta. La biomasa se obtuvo mediante el peso de los componentes estructurales de las plantas en báscula analítica (0.1 mg; Ohaus, NJ, USA), después de secar en una estufa de aire forzado a 75-80 °C hasta peso constante (Roberts *et al.*, 1988).

#### Colonización micorrízica en raíz

El porcentaje de colonización se cuantificó únicamente para los tratamientos con *R. intraradices* Schenk *et* Smith con la técnica de Phillips y Hayman (1970), usando un microscopio óptico con objetivo de inmersión (100 X) en 100 segmentos de raíz con longitud de 1.5-1.6 cm en cada muestreo.

#### Área foliar y análisis foliar

El área foliar se registró en cm<sup>2</sup> con un integrador de área foliar (LI-COR, LI 3100) y el análisis vegetal se realizó en el Laboratorio de Análisis de suelo, agua y planta de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Chiapas, en un equipo ICP-AES (Waltham Massachusetts, EE.UU.) para N y P; y para el contenido de N se usó Kjeldhall.

*R. intraradices*; *Azospirillum*+*Rhizophagus*; Control (without microorganisms); *Glomus* sp. (T; isolated of lemongrass); *Glomus* sp. (V, isolated of vetiver); *Glomus* sp. (T) + *Glomus* sp. (V), with four replications in a completely randomized design. The experimental unit was one pot with one plant. Destructive samples were carried out at 56, 84, 112, 140 and 168 d after sowing, and irrigation was made with distilled water.

### Variables

#### Height, number of leaves, stem diameter and biomass

Height was recorded from the root collar to the apical bud every 28 d. The total number of leaves per plant was measured at each sampling, treatment and replication. The stem diameter was recorded with a digital vernier at a height of 0.5 cm away from the root crown to the apex of the plant. The biomass was obtained by the weight of the structural components of the plants in analytical scale (0.1 mg; Ohaus, NJ, USA), after drying in a forced air oven at 75-80 °C to constant weight (Roberts *et al.*, 1988).

#### Mycorrhizal colonization in root

The percentage of colonization was quantified only for treatments with *R. intraradices* Schenk *et* Smith with Phillips and Hayman (1970) technique, using an optical microscope with a (100 X) immersion objective lens in 100 segments of root with length 1.5-1.6 cm at each sampling.

#### Leaf area and leaf analysis

Leaf area was recorded in cm<sup>2</sup> with a leaf area meter (LI-COR, LI 3100) and the plant analysis was performed at the Laboratory of Analysis of soil, water and plant, in the Faculty of Agronomy of the Autonomous University of Chiapas, with an ICP-AES instrument (Waltham Massachusetts, USA), for N, and P; and for N content the Kjeldhall method was used.

#### Statistical analysis

The experimental design was randomized block and data were analyzed by ANOVA with the GLM procedure of SAS version 9.0, and means were compared with Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

The greatest induction on the number of leaves ( $p \leq 0.05$ ) occurred with the treatments *Glomus* sp.

### Análisis estadístico

El diseño experimental fue bloques al azar y los datos se analizaron con ANDEVA, usando GLM de SAS versión 9.0, y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

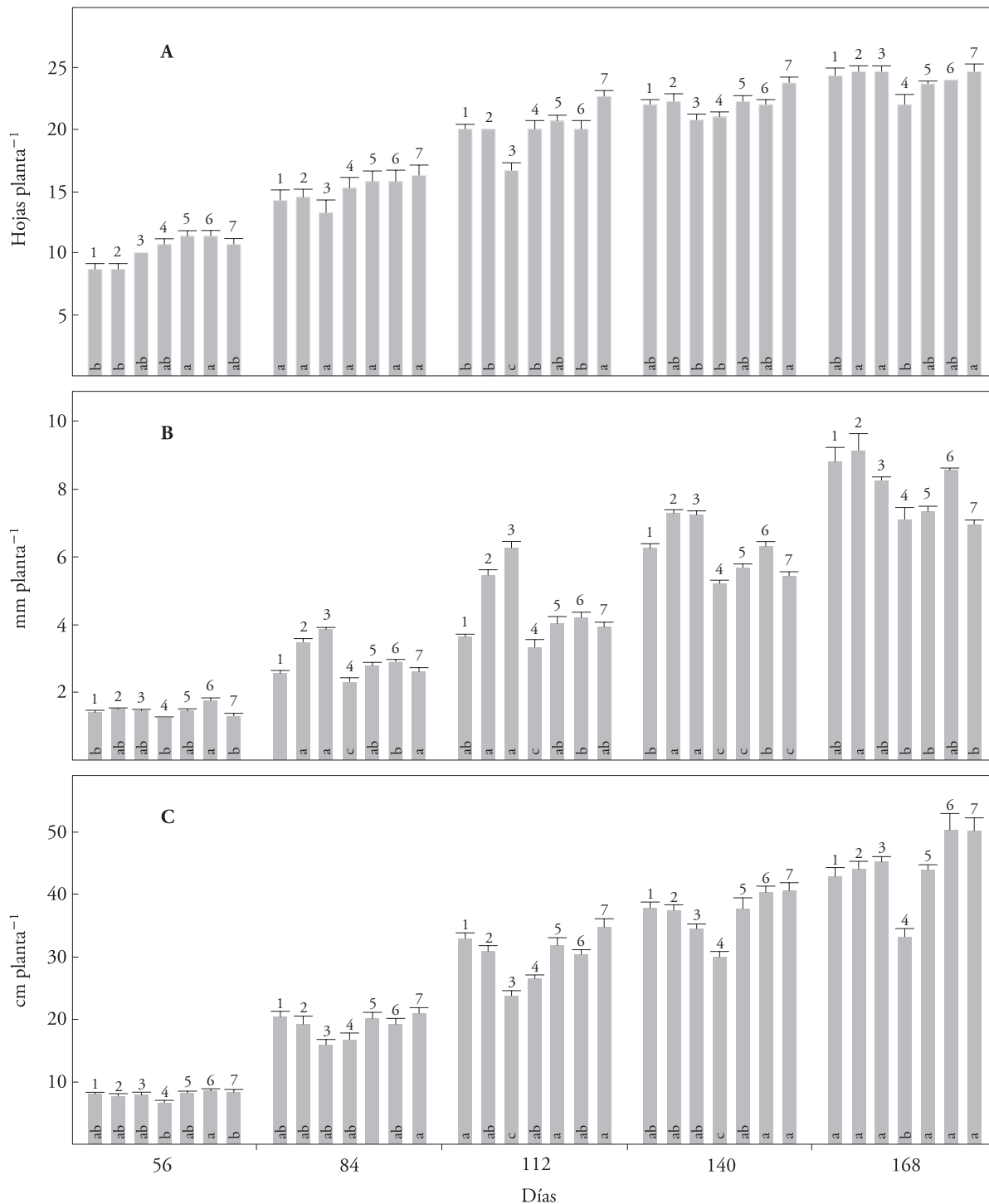
La mayor inducción en el número de hojas ( $p \leq 0.05$ ) se presentó con los tratamientos *Glomus* sp. (T) y *Glomus* sp. (V) al inicio de la evaluación, y después de 140 d *R. intraradices* y *A. brasilense* presentaron un número semejante de hojas respecto a los tratamientos anteriores ( $p > 0.05$ ). El tratamiento testigo presentó en promedio dos hojas menos respecto a los inoculados (Figura 1, Cuadro 1). El incremento en el número de hojas de las plantas inoculadas puede estar relacionado con el aumento en la capacidad de absorción de nutrientes y agua del sistema radical inducido por los microorganismos hacia la planta, especialmente por los hongos micorrízicos, y en el caso de *A. brasilense* mediante la promoción de mayor crecimiento radical en la planta hospedera (Hungria *et al.*, 2004). Los hongos micorrízicos al extender el crecimiento externo del micelio actúan como una extensión de la superficie de absorción de la raíz (Leigh *et al.*, 2009), y como un sistema radical complementario que favorece el aporte de nutrientes y agua a la planta, y cambios en su fisiología (Barea *et al.*, 2002). Hay resultados semejantes en especies perennes como cacao (Aguirre-Medina *et al.*, 2007) y café (Sánchez *et al.*, 2005; Aguirre-Medina *et al.*, 2011).

Las plantas con *R. intraradices* presentaron la mayor colonización micorrízica inicial. A los 84 d hubo una fase de letargo de la colonización en todos los tratamientos, excepto para aquellos con *Glomus* sp. (T) cuya fase fue a los 112 d. A los 56 y 84 d no hubo diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) en número de hojas y altura de planta, excepto en número inicial de hojas posiblemente influenciado por la fase de establecimiento de los microorganismos en la raíz, que durante este periodo demandan mayor cantidad de fotosintatos. En todos los tratamientos la colonización mayor se alcanzó a los 168 d entre 60 % y 70 % en el sistema radical (Figura 2). La presencia de dichas fases de colonización radical (inicial, lenta y extensiva o constante)

(T) and *Glomus* sp. (V) at the start of the evaluation, and after 140 d *R. intraradices* and *A. brasilense* showed a similar number of leaves with respect to the previous treatments ( $p > 0.05$ ). The control treatment showed an average of two leaves less compared to the inoculated ones (Figure 1, Table 1). The increase in leaf number of inoculated plants could be related to the increase of nutrient and water uptake ability from the root system induced by microorganisms to the plant, especially by mycorrhizal fungi, and in the case of *A. brasilense* by promoting higher root growth in the host plant (Hungria *et al.*, 2004). Mycorrhizal fungi extending mycelial outgrowth act as an extension of the absorption surface of the root (Leigh *et al.*, 2009), and as a complementary radical system favoring the supply of nutrients and water to the plant and thus, changes in their physiology (Barea *et al.*, 2002). There are similar results in perennial species as cacao (Aguirre-Medina *et al.*, 2007) and coffee (Sánchez *et al.*, 2005; Aguirre-Medina *et al.*, 2011).

Plants with *R. intraradices* had the highest initial mycorrhizal colonization. At 84 d a dormant phase of colonization occurred in all treatments except for those with *Glomus* sp. (T) whose stage was at 112 d. At 56 and 84 d there were no statistical differences ( $p > 0.05$ ) in number of leaves and plant height, except the initial number of leaves possibly influenced by the establishment phase of the microorganisms at the root, that during this period demand larger amount of photosynthates. In all treatments, the greatest colonization was reached at 168 d between 60 % and 70 % in the root system (Figure 2). The presence of these phases of root colonization (initial, slow and extended or constant) occurs in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with intervals of 10 to 20 d (Aguirre-Medina and Kohashi, 2002), but in this study the combination of *Glomus* sp. (T+V) showed low initial colonization without the slow phase before the extensive one (Figure 2).

Stem diameter increased in plants inoculated with microorganisms from the onset of the study, compared with the control. *Rhizophagus intraradices* inoculation alone and in combination with *A. brasilense* and plants with *Glomus* sp. (V), showed greater stem diameter throughout the assessment from 56 d and was statistically different ( $p \leq 0.0006$ ) (Table 1). Regarding plant height, significant statistical differences ( $p \leq 0.0001$ ) occurred from



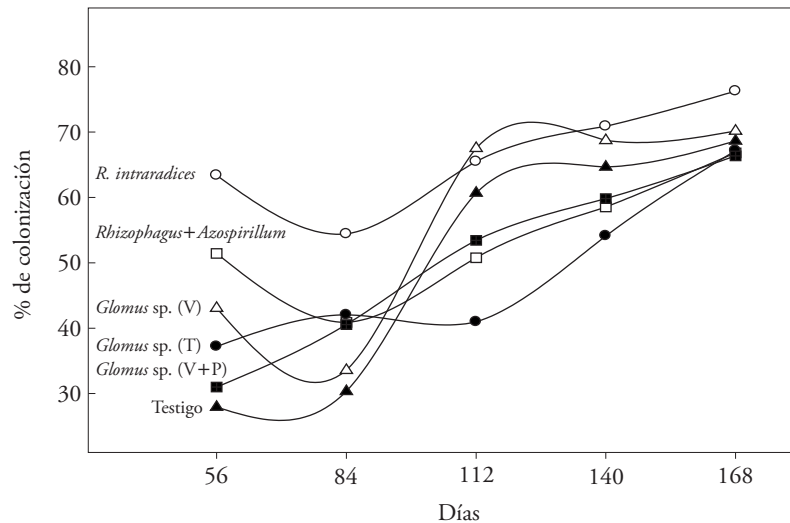
**Figura 1. Componentes morfológicos: número de hojas (A), diámetro del tallo (B) y altura de plantas (C) de *Tabebuia donnell-smithii* Rose biofertilizadas con *Azospirillum brasilense*, *Rhizopagus intraradices* y *Glomus* sp., en un suelo andosol-mólico del Soconusco, Chiapas. Letras diferentes en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). Los valores son promedios de cuatro repeticiones por muestreo y tratamiento  $\pm$  el error estándar. 1: *Azospirillum brasilense*; 2: *Rhizopagus intraradices*; 3: *A. brasilense*+*R. intraradices*; 4: Testigo; 5: *Glomus* sp. T; 6: *Glomus* sp. V; 7: *Glomus* T+V.**

**Figure 1. Morphologic components: number of leaves (A), stem diameter (B) and plant height (C) of *Tabebuia donnell-smithii* Rose biofertilized with *Azospirillum brasilense*, *Rhizopagus intraradices* and *Glomus* sp., in an Andosol-mollic soil of Soconusco, Chiapas. Different letters in a column are statistically different ( $p \leq 0.05$ ). Values are average of four replications by sampling and treatment  $\pm$  the standard error. 1: *Azospirillum brasilense*; 2: *Rhizopagus intraradices*; 3: *A. brasilense*+*R. intraradices*; 4: Control; 5: *Glomus* sp. T; 6: *Glomus* sp. V; 7: *Glomus* T+V.**

**Cuadro 1. Peso seco de raíz, tallo y hoja, y área foliar de plantas de *Tabebuia donnell-smithii* Rose biofertilizadas con *Azospirillum brasilense*, *Rhizophagus intraradices* y *Glomus* sp. en un suelo andosol-mólico del Soconusco, Chiapas.**  
**Table 1. Dry weight of root, stem and leaf, and leaf area of plants of *Tabebuia donnell-smithii* Rose biofertilized with *Azospirillum brasilense*, *Rhizophagus intraradices* and *Glomus* sp. in an Andosol-mollic soil of the Soconusco, Chiapas.**

Variable	Días													
	56			84			112			140			168	
	CME	Fc		CME	Fc		CME	Fc		CME	Fc		CME	Fc
Numero de hojas	0.762142	6.71 **		3.0238	1.46 NS		1.1430	10.8 **		0.9047	4.24 *		1.1113	3.35*
Diámetro de tallo (mm)	0.0162	6.47 **		0.0436	27.82 **		0.12440	35.6 **		0.0619	44.1 **		0.4787	4.27**
Altrura (cm)	0.6407	2.37 *		4.2222	3.43 *		4.0761	14.0 **		5.3574	9.96 **		10.6950	12.2**
Peso seco raíz (g)	0.0006	12.17**		0.0049	145.87**		0.1310	36.39**		0.0800	38.1**		0.4094	7.8**
Peso seco tallo (g)	0.0001	59.1**		0.0247	45.03 **		0.0633	45.7**		0.0713	42.6**		0.4425	9.13**
Peso seco hoja (g)	0.0059	4.45*		0.0740	6.51**		0.1103	16.5**		0.6050	6.63**		0.7464	11.3*
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	388.49	8.58**		1222.95	76.88**		18530.9	18.6**		43594.8	8.25**		38134.6	14.7*

CME: cuadrado medio del error. Fc: F calculada. NS: no significativo, CV: coeficiente de variación. \*p ≤ 0.05 ❖ CME: mean square error. Fc: calculated F. NS: not significant, CV: coefficient of variation. \* p ≤ 0.05.



**Figura 2.** Colonización micorrízica en la raíz de plantas de *Tabebuia donnell-smithii* Rose con *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglyphus intraradices* y *Glomus sp.* en un suelo andosol-mólico del Soconusco, Chiapas.

**Figure 2.** Mycorrhizal colonization in the root of plants *Tabebuia donnell-smithii* Rose with *Azospirillum brasilense*, *Rhizoglyphus intraradices* and *Glomus sp.* in an Andosol-mollic soil of Soconusco, Chiapas.

ocurre en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con intervalos de 10 a 20 d (Aguirre-Medina y Kohashi, 2002), pero en el presente estudio la combinación de *Glomus sp.* (T+V) mostró baja colonización inicial sin la fase lenta antes de la extensiva (Figura 2).

El diámetro del tallo aumentó en las plantas inoculadas con los microorganismos desde el inicio del estudio, comparado con el testigo. La inoculación de *R. intraradices* sola y en combinación con *A. brasilense* y las plantas con *Glomus sp.* (V), mostraron mayor grosor del tallo durante toda la evaluación desde los 56 d y fue estadísticamente diferente ( $p \leq 0.0006$ ) (Cuadro 1). Respecto a la altura de la planta, hubo diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.0001$ ) desde el tercer muestreo (112 d). Durante los dos primeros muestreos las diferencias en altura fueron inferiores en 2 cm en los tratamientos con microorganismos, comparado con el testigo; y en el tercero, cuarto y quinto muestreo, las plantas con mayor altura fueron las inoculadas con *Glomus sp.* (V) y la combinación *Glomus sp.* (T+V), atribuible a mayor compatibilidad planta-microorganismo. Las diferencias significativas finales fueron 6 a 8 cm entre los tratamientos inoculados y de 16 cm de éstos comparados con el testigo. En cacao, Aguirre-Medina *et al.* (2007) reportan diferencias promedio en altura de planta de 9 cm en plantas inoculadas con

the third sampling (112 d). During the first two samplings differences in height were lower in 2 cm in treatments with microorganisms compared to the control; and in the third, fourth and fifth samplings, plants with greater height were those inoculated with *Glomus sp.* (V) and the combination *Glomus sp.* (T+V), attributable to a higher compatibility plant-microorganism. The final significant differences were 6 to 8 cm between the inoculated treatments and of 16 cm of these in comparison with the control. In cocoa, Aguirre-Medina *et al.* (2007) reported average differences in plant height of 9 cm in plants inoculated with *R. intraradices* in comparison with the control from the 120 d. The different response between the isolations of *Glomus sp.* and *R. intraradices* suggests the functional compatibility between the host plant and fungus (Cuenca *et al.*, 2007).

#### Dry weight of root, stem, leaf and leaf area

The greatest biomass accumulated in the root system was recorded with *Glomus sp.* (V) and was statistically different ( $p \leq 0.0001$ ) from the other treatments. During the following samplings this situation occurred in *R. intraradices* and combination with *A. brasilense*. The greatest growth in the root system may be related to the



*R. intraradices*, comparado con el testigo, desde los 120 d. La respuesta diferente entre los aislamientos de *Glomus* sp. y *R. intraradices* sugiere la compatibilidad funcional entre la planta hospedera y el hongo (Cuenca *et al.*, 2007).

### Peso seco de raíz, tallo, hoja y área foliar

La mayor biomasa acumulada en el sistema radical se registró con *Glomus* sp. (V) y fue estadísticamente diferente ( $p \leq 0.0001$ ) a los otros tratamientos. Durante los siguientes muestreos esta situación se presentó en *R. intraradices* y la combinación con *A. brasilense*. El mayor aumento en el sistema radical puede estar relacionado con el aumento de algunas sustancias del crecimiento, producto de la simbiosis entre la planta y los microorganismos (Cuadro 2). *Azospirillum brasilense* promueve el desarrollo de la raíz mediante la producción de fitohormonas como el ácido indol acético (Hungria *et al.*, 2004) y vitaminas (Reis-Junior *et al.*, 2004; Dobbelaere *et al.*, 2003) los cuales modifican la morfología de la raíz y aumentan su biomasa. En estudios realizados con *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerdemann & Trappe colonizando *Bouteloa gracilis* (Willd. ex Kunth) Lag. ex Griffiths hubo aumentos significativos de giberelinas en hojas con una tendencia a reducir la actividad de las giberelinas en la raíz (Allen *et al.*, 1982). Además, *A. brasilense* puede inducir mayor desarrollo radical en plantas anuales cuando se inocula como simbiosis doble de *Azospirillum-Glomus* en *Phaseolus vulgaris* L. y *Zea mays* L. (Dobbelaere *et al.*, 2003).

El peso seco del tallo principal presentó mayor biomasa en los tratamientos inoculados con hongos y bacteria, solos o combinados, comparado con el testigo. Sin embargo, entre microorganismos *Glomus* sp. (T) estimuló mayor crecimiento del tallo a los 56 d, mientras que *R. intraradices* y la simbiosis doble con *R. intraradices* y *A. brasilense* mostraron mayor biomasa del tallo ( $p \leq 0.05$ ) a los 84, 112, 140 y 168 d, comparados con los otros tratamientos (Cuadro 2).

El peso seco de hoja presentó la misma tendencia que el tallo, es decir, mayor producción de biomasa ( $p \leq 0.05$ ) de hojas de plantas inoculadas con *R. intraradices*, la combinación *R. intraradices*+*A. brasilense* a los 56, 84 y 112 d, y *Glomus* sp. (V) a los 140 y 168 d (Cuadro 2). En estudios realizados

increase of some growth substances resulting from the symbiosis between plant and microorganisms (Table 2). *Azospirillum brasilense* promotes root development by producing phytohormones such as indoleacetic acid (Hungria *et al.*, 2004) and vitamins (Reis-Junior *et al.*, 2004; Dobbelaere *et al.*, 2003) which modify the morphology of the root and increase its biomass. In studies with *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerdemann & Trappe colonizing *Bouteloa gracilis* (Willd. ex Kunth) Lag. ex Griffiths significant increases were recorded of gibberellins in leaves with a tendency to decrease gibberellin activity at the root (Allen *et al.*, 1982). Besides, *A. brasilense* can induce greater radical development in annual plants when it is inoculated as double symbiosis of *Azospirillum-Glomus* in *Phaseolus vulgaris* L. and *Zea mays* L. (Dobbelaere *et al.*, 2003).

The dry weight of the main stem had greater biomass in the treatments inoculated with fungi and bacteria, alone or in combination, compared with the control. However, among microorganisms *Glomus* sp. (T) stimulated a greater growth of stem at 56 d, whereas *R. intraradices* and the double symbiosis with *R. intraradices* and *A. brasilense* showed higher stem biomass ( $p \leq 0.05$ ) at 84, 112, 140 and 168 d, compared to the other treatments (Table 2).

The dry weight of leaf showed the same stem trend, that is, greater biomass production ( $p \leq 0.05$ ) of leaves of plants inoculated with *R. intraradices*, the combination *R. intraradices*+*A. brasilense* at 56, 84 and 112 d, and *Glomus* sp. (V) at 140 and 168 d (Table 2). In studies with woody plants such as *L. leucocephala* (Lam.) De Wit and *T. cacao* L. inoculated with the symbiosis *Glomus-Rhizobium* and *Azospirillum*, respectively, increases were observed in these same yield components (Aguirre-Medina *et al.*, 2007). Plants bio-fertilized with *A. brasilense* or *Glomus* had greater leaf area throughout the study compared to the control; however, with *A. brasilense* more vigorous plants (Dobbelaere *et al.*, 2001) were achieved with statistically significant differences (Table 2). Regarding *R. intraradices* inoculated plants showed higher leaf area in the first three samplings and compared to the other treatments ( $p \leq 0.05$ ), but from the fourth and fifth sampling, the greatest the leaf area was observed with *Glomus* sp. (V). Sánchez *et al.* (2005) found

**Cuadro 2. Peso seco de raíz, tallo y hoja, y área foliar de plantas de *Tabebuia donnell-smithii* Rose biofertilizadas con *Azospirillum brasilense*, *Rhizophagus intraradices* y *Glomus* sp. en un suelo andosol-mólico del Soconusco, Chiapas.**

**Table 2. Dry weight of root, stem and leaf, and leaf area of plants *Tabebuia donnell-smithii* Rose biofertilized with *Azospirillum brasilense*, *Rhizophagus intraradices* and *Glomus* sp. in an Andosol-mollic soil of Soconusco, Chiapas.**

Días	Tratamiento	Raíz (g)	Tallo (g)	Hoja (g)	Área foliar cm <sup>2</sup>
56	<i>A. brasilense</i>	0.07 ± 0.01 c	0.06 ± 0.0004 c	0.23 ± 0.01b	101.9 ± 10.5 abc
	<i>R. intraradices</i>	0.10 ± 0.005 bc	0.07 ± 0.001c	0.29 ± 0.01ab	86.5 ± 4.8 c
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	0.14 ± 0.01ab	0.13 ± 0.002 b	0.46 ± 0.007 a	138.4 ± 13.1 ab
	Testigo	0.06 ± 0.01c	0.05 ± 0.0005 c	0.25 ± 0.02 b	60.9 ± 8.5 c
	<i>Glomus</i> sp. (T)	0.07 ± 0.007 c	0.16 ± 0.0007 a	0.29 ± 0.07ab	96.6 ± 5.8 bc
	<i>Glomus</i> sp. (V)	0.17 ± 0.02 a	0.11 ± 0.0003 b	0.36 ± 0.04ab	143.4 ± 15.6 a
	<i>Glomus</i> sp. (T)+ <i>Glomus</i> sp. (V)	0.07 ± 0.01 c	0.07 ± 0.0009 c	0.26 ± 0.03b	97.2 ± 4.6 bc
		CV=23.1	CV=10.5	CV=24.8	CV=19.0
84	<i>A. brasilense</i>	0.7 ± 0.003 d	0.4 ± 0.06 b	1.1 ± 0.04 bc	475.7 ± 17.9 c
	<i>R. intraradices</i>	1.6 ± 0.02 a	1.4 ± 0.14 a	1.8 ± 0.09 a	728.5 ± 24.6 a
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	1.7 ± 0.01a	1.8 ± 0.10 a	1.7 ± 0.24 a	648.0 ± 17.7 b
	Testigo	0.6 ± 0.01 d	0.5 ± 0.01b	0.9 ± 0.09 c	320.3 ± 15.8 d
	<i>Glomus</i> sp. (T)	1.2 ± 0.03b	0.7 ± 0.08 b	1.6 ± 0.08 ab	712.9 ± 9.6 ab
	<i>Glomus</i> sp. (V)	1.1 ± 0.07 bc	0.6 ± 0.01 b	1.7 ± 0.14 ab	715.2 ± 16.1 ab
	<i>Glomus</i> sp. (T)+ <i>Glomus</i> sp.(V)	1.0 ± 0.03 c	0.5 ± 0.01 b	1.5 ± 0.13 ab	654.3 ± 16.9 ab
		CV=6.0	CV=17.4	CV=17.0	CV=5.7
112	<i>A. brasilense</i>	0.8 ± 0.03 b	1.3 ± 0.03 c	1.9 ± 0.11b	849.6 ± 81.7 bc
	<i>R. intraradices</i>	2.8 ± 0.29 a	3.2 ± 0.20 a	3.3 ± 0.18 a	1390.2 ± 74.2 a
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	3.6 ± 0.29 a	3.4 ± 0.07 a	3.3 ± 0.09a	1158.9 ± 70.5 ab
	Testigo	0.9 ± 0.15 b	1.2 ± 0.14 c	1.6 ± 0.20 b	579.9 ± 72.6 c
	<i>Glomus</i> sp. (T)	1.3 ± 0.13 b	2.2 ± 0.17 b	2.9 ± 0.15 a	1328.5 ± 83.9 a
	<i>Glomus</i> sp. (V)	1.0 ± 0.04b	2.1 ± 0.07b	3.0 ± 0.25 a	1287.0 ± 26.3 a
	<i>Glomus</i> sp. (T)+ <i>Glomus</i> sp.(V)	1.0 ± 0.08b	1.9 ± 0.08 b	2.8 ± 0.06a	1211.6 ± 47.1 a
		CV=21.6	CV=11.2	CV=12.1	CV=12.2
140	<i>A. brasilense</i>	3.3 ± 0.18 d	3.3 ± 0.04 b	5.1 ± 0.13 bc	1577.5 ± 59.7 a
	<i>R. intraradices</i>	4.9 ± 0.05 a	5.0 ± 0.05 a	6.5 ± 0.66 ab	1747.9 ± 87.6 a
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	4.7 ± 0.13 ab	4.9 ± 0.10 a	6.3 ± 0.16 ab	1816.3 ± 98.1 a
	Testigo	2.4 ± 0.14 e	2.8 ± 0.07 b	3.9 ± 0.17 c	1059.3±50.4 b
	<i>Glomus</i> sp. (T)	3.5 ± 0.12 d	3.3 ± 0.16 b	5.3 ± 0.18 abc	1788.7 ± 138.5 a
	<i>Glomus</i> sp. (V)	4.1 ± 0.19 bc	3.6 ± 0.23 b	6.9 ± 0.62 a	2010.2 ± 108.1 a
	<i>Glomus</i> sp. (T)+ <i>Glomus</i> sp.(V)	3.6 ± 0.08 cd	3.3 ± 0.14 b	5.5 ± 0.33abc	1633.1 ± 148.1 a
		CV=7.3	CV=7.1	CV=13.6	CV=12.5
168	<i>A. brasilense</i>	5.8 ± 0.45 bc	5.1 ± 0.17 abc	8.2 ± 0.25 bc	2307.3 ± 86.5 ab
	<i>R. intraradices</i>	7.5 ± 0.28 a	6.6 ± 0.21 a	9.6 ± 0.30 ab	2125.3 ± 65.4 b
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	6.2 ± 0.21 ab	5.9 ± 0.13 ab	9.4 ± 0.61 ab	2473.3 ± 115.4 ab
	Testigo	4.6 ± 0.35 c	3.6 ± 0.34 c	6.3 ± 0.39 c	1534.0 ± 124.7 c
	<i>Glomus</i> sp. (T)	5.3 ± 0.09 bc	4.8 ± 0.07 bc	7.7 ± 0.17 bc	2251.3 ± 32.5 b
	<i>Glomus</i> sp. (V)	6.3 ± 0.32 ab	6.3 ± 0.49 ab	10.7 ± 0.56 a	2733.3 ± 132.8 a
	<i>Glomus</i> sp. (T)+ <i>Glomus</i> sp.(V)	5.5 ± 0.37 bc	5.5 ± 0.55 ab	8.1 ± 0.51 bc	2055.0 ± 85.9 b
		CV=10.7	CV=12.1	CV=10.0	CV=8.8

CV: coeficiente de variación (%). \*Valores con diferente letra dentro de cada fecha son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) ❖ CV : coefficient of variation (%). \*Values with different letter within each date are statistical different ( $p \leq 0.05$ ).

con plantas leñosas como *L. leucocephala* (Lam.) De Wit y *T. cacao* L. inoculadas con la simbiosis *Glomus-Rhizobium* y *Azospirillum*, respectivamente, hubo aumentos en estos mismos componentes del rendimiento (Aguirre-Medina *et al.*, 2007). Las plantas biofertilizadas con *A. brasilense* o *Glomus* tuvieron mayor área foliar durante todo el estudio en comparación con el testigo; sin embargo, con *A. brasilense* se lograron plantas más vigorosas (Dobbelaere *et al.*, 2001) con diferencias estadísticas significativas (Cuadro 2). Respecto a *R. intraradices*, las plantas inoculadas mostraron mayor área foliar en los tres primeros muestreos respecto a los otros tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), aunque desde el cuarto y quinto muestreo la mayor área foliar se observó con *Glomus* sp. (V). Sánchez *et al.* (2005) encontraron que plantas de *C. arabica* L. micorrizadas mostraron mayor inducción del área foliar.

Los resultados anteriores indican que la acumulación de materia seca en los componentes de la planta de *T. donnell-smithii* Rose, varía según el microorganismo aplicado a través del tiempo de colonización. La simbiosis doble *Rhizophagus*+*Azospirillum* fue la mejor combinación para incrementar la biomasa durante la primera etapa de evaluación, y cuando se alcanzó más del 50 % de la colonización de la raíz. A los 56 d, la mayoría de los microorganismos indujeron entre 53 y 63 % de la biomasa a la lámina foliar; en cambio, para *Glomus* sp. (T) fue 48 % y para el testigo 47 % para este componente de la planta. Al mismo tiempo, las plantas de estos tratamientos asignaron 33 % a la biomasa al tallo y representó casi el doble respecto a los otros tratamientos, mientras que para el testigo fue 38 % de la biomasa al sistema radical y también fue casi el doble de los otros tratamientos. El tratamiento *Glomus* sp. (T) y el testigo causaron colonización radical por los hongos micorrizicos entre 27 y 38 % lo cual fue 23 y 12 % menos, comparado con los otros tratamientos.

A los 84 y 112 d, la acumulación de materia seca total y la colonización radical aumentaron con *R. intraradices*. La asignación de biomasa a la lámina foliar fue similar entre los tratamientos, excepto *R. intraradices* y la simbiosis doble de *R. intraradices*+*A. brasilense* con 13 % menos, pero estos tratamientos aumentaron en promedio 14 % la biomasa radical comparado con *A. brasilense*, *Glomus* sp. (T), *Glomus* sp. (V) y la

that *C. arabica* L. mycorrhized plants showed greater induction of leaf area.

The above results indicate that accumulation of dry matter in the plant components of *T. donnell-smithii* Rose, varies depending on the microorganism applied over time of colonization. The double symbiosis *Rhizophagus*+*Azospirillum* was the best combination to increase the biomass during the first stage of evaluation, and when over 50 % of root colonization was achieved. At 56 d, most of the microorganisms induced between 53 and 63 % of the biomass to the leaf blade; however, for *Glomus* sp. (T) it was 48 % and for the control 47 % for this component of the plant. At the same time plants of these treatments allocated 33 % to the stem biomass and represented almost twice of the other treatments, whereas for the control it was 38 % of the biomass to the root system and it also was almost twice compared to the other treatments. Treatment *Glomus* sp. (T) and the control caused root colonization by mycorrhizal fungi between 27 and 38 %, which was 23 and 12 % less compared to the other treatments.

At 84 and 112 d, the accumulation of total dry matter and root colonization increased with *R. intraradices*. The allocation of biomass to the leaf blade was similar among treatments, except for *R. intraradices* and the double symbiosis of *R. intraradices*+*A. brasilense* that allocated 13 % less, but these treatments increased root biomass on average 14 % compared with *A. brasilense*, *Glomus* sp. (T), *Glomus* sp. (V) and the co-inoculation of both. The increase in the colonization of *Glomus* sp. (V) from 112 d coincides with the greatest development of the plant, as is the allocation of dry matter by yield component, suggesting the importance of the plant-fungus interaction and its effect on vegetal development. At the end of evaluation (168 d), leaf biomass fluctuated 40 to 46 % between treatments, with the exception of the double inoculation of *Glomus* sp. (T+V), with 38 %. In the stem, biomass accumulation was 25 to 28 % between treatments, but in the root system contrasting fluctuations occurred since plants inoculated with *Glomus* sp. allocated 29 to 30 % of biomass to the root, the co-inoculation of *Glomus* sp. (T+V) 23 % and the control 25 %. In contrast, in plants inoculated with *A. brasilense* a greater root development was induced. The delayed response of microorganisms *Glomus* sp. (T) and *Glomus* sp. (V) to induce production of root

coinoculación de ambas. El incremento en la colonización de *Glomus* sp. (V) desde los 112 d coincide con el mayor desarrollo de la planta, como es la asignación de materia seca por componente del rendimiento, lo cual sugiere la importancia de la interacción planta-hongo y su efecto en el desarrollo vegetal. Al final de la evaluación (168 d), la biomasa foliar fluctuó de 40 a 46 % entre tratamientos, excepto la inoculación doble de *Glomus* sp. (T+V), con 38 %. En el tallo, la acumulación de biomasa varió de 25 a 28 % entre tratamientos, pero en el sistema radical hubo fluctuaciones contrastantes ya que las plantas inoculadas con *Glomus* sp., asignaron 29 a 30 % de biomasa a la raíz, la coinoculación de *Glomus* sp. (T+V) 23 % y el testigo 25 %. En cambio, en plantas inoculadas con *A. brasilense* se indujo mayor desarrollo radical. La respuesta tardía de los microorganismos *Glomus* sp. (T) y *Glomus* sp. (V) para inducir la producción de biomasa radical, posiblemente se deba a que demandan más tiempo para su establecimiento y colonización. En el cafeto, Parra *et al.* (1990) observaron beneficios de la simbiosis endomicorrizica después de 100 d de la inoculación. Según Aguirre-Medina *et al.* (2011), no hay diferencia entre 60 y 90 d en plantas de cafeto; tiempos similares a lo encontrado en la presente investigación. En Melina (*Gmelina arborea* Roxb), Zambrano y Lucía (2008) señalan que las bacterias promueven selectivamente el establecimiento de la simbiosis con los hongos.

En todos los tratamientos la materia seca disminuyó después de un periodo de aumento, lo cual posiblemente esté relacionado con las fases de desarrollo de la micorriza en cultivos anuales donde hay una fase inicial, otra de desarrollo extensivo y una más al final o constante (Aguirre-Medina y Kohashi, 2002). O bien, se debe a la capacidad de la planta para proporcionar fotosintatos al hongo y la concomitante disminución de transporte de nutrientes a la planta. Esta respuesta sugiere que los microorganismos inducen de manera diferencial el desarrollo vegetal de *T. donnell-smithii* Rose, lo cual podría explicar la baja interacción inicial de los microorganismos con la raíz y su efecto en la toma de carbohidratos, o bien, la utilización de energía para favorecer los mecanismos de reconocimiento planta-bacteria que permiten el establecimiento de la simbiosis.

biomass, possibly is due to the fact that they demand more time for their establishment and colonization. In coffee, Parra *et al.* (1990) found that the benefits from the endomycorrhizic symbiosis are observed 100 d after inoculation. According to Aguirre-Medina *et al.* (2011), there is no difference between 60 and 90 d in coffee plants, similar times to that found in the present investigation. In Melina (*Gmelina arborea* Roxb), Zambrano and Lucia (2008) indicate that bacteria selectively promote the establishment of symbiosis with fungi.

In all treatments dry matter decreased after a period of increase, which is possibly related with the phases of mycorrhiza development in annual crops where there is an initial phase, other of extensive development and one more at the end or constant (Aguirre-Medina and Kohashi, 2002). Or it is due the ability of the plant to provide photosynthates for the fungus and the concomitant decrease in nutrient transport to the plant. This response suggests that microorganisms differentially induce vegetal growth of *T. donnell-smithii* Rose, which could explain the low initial interaction of microorganisms with the root and its effect on carbohydrate intake, or the use of energy to promote the mechanisms of recognition plant-bacteria that allow the establishment of the symbiosis.

### Nitrogen and phosphorus content

Nitrogen content in the vegetal tissue of plants inoculated with *R. intraradices*, *Rhizophagus*+*Azospirillum* and *Glomus* sp. (T) was different ( $p \leq 0.05$ ) between the stem and root, whereas the amounts for both organisms were similar in the other treatments (Figure 3). In the shoot, inoculation with *R. intraradices* was statistically different from the other treatments, and for the root system the greatest amount of N was reached with the inoculation of *A. brasilense*, which was different ( $p \leq 0.05$ ) from other treatments. On average, nitrogen content of the shoot and root was higher in plants with *R. intraradices*, *A. brasilense* and *Glomus* sp. (T)+(V) and *Glomus* sp. (V) compared to the control. Sánchez *et al.* (2005) attributed the increased growth of plants inoculated with mycorrhizic fungi to nutritional effects derived of the symbiosis. The transport of nitrogen and other elements is influenced by the mycorrhizic symbiosis (Clark

### Contenido de nitrógeno y fósforo

El contenido de nitrógeno en el tejido vegetal de plantas inoculadas con *R. intraradices*, *Rhizophagus*+*Azospirillum* y *Glomus* sp. (T) fue diferente ( $p \leq 0.05$ ) entre el vástago y raíz, mientras que las cantidades para ambos órganos fueron semejantes en los otros tratamientos (Figura 3). En el vástago, la inoculación con *R. intraradices* fue estadísticamente diferente a los otros tratamientos, y para el sistema radical la mayor cantidad de N se alcanzó con la inoculación de *A. brasilense*, y ( $p \leq 0.05$ ) diferente a los otros tratamientos. En promedio el contenido de nitrógeno del vástago y raíz fue mayor en las plantas con *R. intraradices*, *A. brasilense* y con *Glomus* sp. (T)+(V) y *Glomus* sp. (V) respecto al testigo. Sánchez *et al.* (2005) atribuyen el mayor crecimiento de las plantas inoculadas con hongos micorrízicos a efectos nutrimentales derivados de la simbiosis. El transporte de nitrógeno y otros elementos es influenciado por la simbiosis micorrízica (Clark y Zeto, 2000), y la mejoría de la nutrición mineral, según Schweiger y Jakobsen (2000), se relaciona con la absorción de nutrientes por la hifa extraradical y su transporte a la planta. La Figura 3 muestra que el contenido de fósforo en el vástago de las plantas inoculadas con *R. intraradices* o *A. brasilense* fue más alto y diferente ( $p \leq 0.05$ ) a los demás, mientras que la menor cantidad fue en plantas testigo; esto es un aumento de 0.6 % en los tratamientos biofertilizados. Las plantas micorrizadas absorben fósforo del suelo más eficientemente que las plantas no colonizadas (Siqueira *et al.*, 1998) y su contenido de fósforo es mayor (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2005). Este efecto en la utilización del fósforo es especialmente importante porque puede reducir la necesidad de aplicación del fertilizante fosforado inorgánico especialmente en la fase de vivero, como lo sugieren Siqueira *et al.* (1998).

### CONCLUSIONES

La inoculación de plantas de dos semanas de edad de *Tabebuia donnell-smithii* Rose con *Rhizophagus intraradices* y combinada con *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. (V) promovieron mayor crecimiento vegetal. La inducción del crecimiento fue diferencial en tiempo e interacción de los microorganismos respecto a los órganos de la planta evaluados. La velocidad

and Zeto, 2000), and the improvement of mineral nutrition, according to Schweiger and Jakobsen (2000), relates to the absorption of nutrients by the extraradical hyphae and their transport to the plant. Figure 3 shows that the phosphorus content in the shoot of the plants inoculated with *R. intraradices* or *A. brasilense* was higher and different ( $p \leq 0.05$ ) to the others, whereas the smaller amount was in control plants; that is an increase of 0.6 % in the bio-fertilized treatments. Mycorrhizal plants absorb phosphorus from the soil more efficiently than not colonized plants (Siqueira *et al.*, 1998) and their phosphorus content is higher (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2005). This effect on the use of phosphorus is especially important because it can reduce the need for application of inorganic phosphate fertilizer origin especially in the nursery stage as suggested by Siqueira *et al.* (1998).

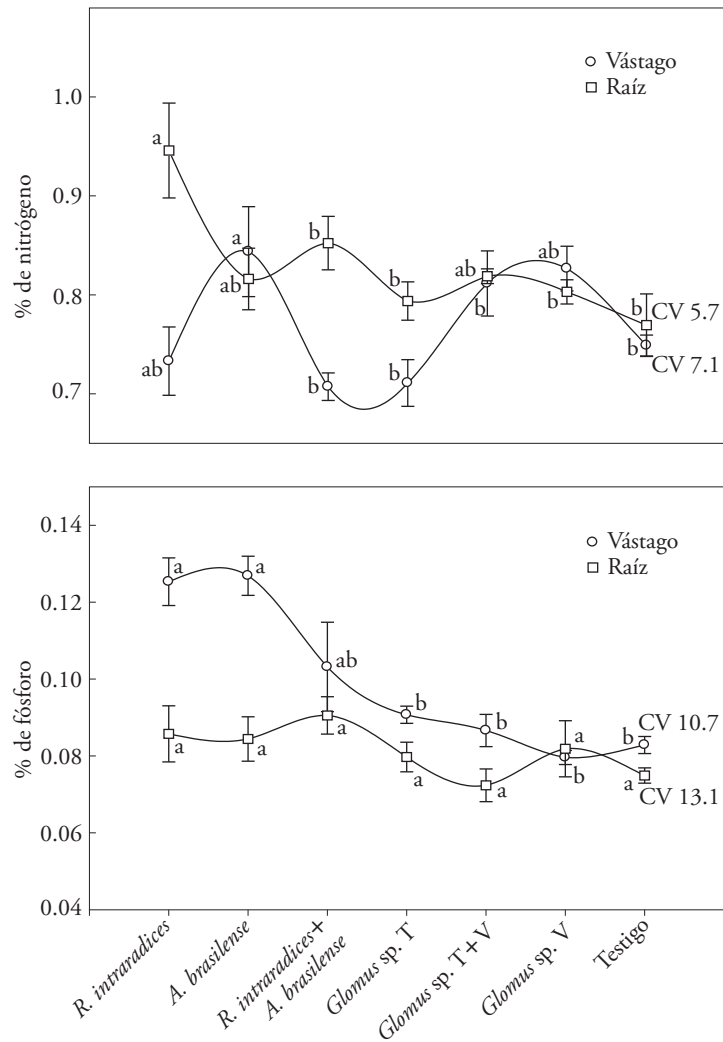
### CONCLUSIONS

Inoculation of two-week old plants of *Tabebuia donnell-smithii* Rose with *Rhizophagus intraradices* and combined with *Azospirillum brasilense* and *Glomus* sp. (V) promoted greater vegetal growth. Induction of growth was differential in time and interaction of microorganisms with respect to organs of plant evaluated. The velocity in the initial vegetal growth induction coincided with treatments with higher percentage of initial mycorrhizal colonization given by *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense* and the final colonization with *Glomus* sp. (V). The highest concentration of nitrogen and phosphorus occurred in inoculated plants with *Rhizophagus intraradices* and in the co-inoculated by *Azospirillum brasilense* and *Glomus* sp. (T) in root for the first element and in shoot for phosphorus.

—End of the English version—



en la inducción del crecimiento vegetal inicial coincidió con los tratamientos de mayor porcentaje de colonización micorrízica inicial dada por *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense* y la colonización final con *Glomus* sp. (V). La mayor concentración de nitrógeno y fósforo ocurrió en plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* y en las coinoculadas



**Figura 3.** Contenido de nitrógeno y fósforo en vástago y raíz de plantas de *Tabebuia donnell-smithii* Rose, biofertilizada con diferentes microorganismos en vivero. La línea vertical indica  $\pm$  el error estándar de tres repeticiones a los 168 d. \* Valores con diferente letra dentro de cada variable (raíz o vástago) son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 3.** Nitrogen and phosphorus content in shoot and root of plants *Tabebuia donnell-smithii* Rose, biofertilized with different microorganisms under nursery. Vertical line indicates  $\pm$  the standard error of three replications at 168 d. \*Values with different letter within each variable (root or shoot) are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

por *Azospirillum brasilense* y *Glomus* sp. (T), en raíz para el primer elemento y en vástago para fósforo.

### LITERATURA CITADA

Aguirre-Medina, J. F., y J. Kohashi-Shibata. 2002. Dinámica de la colonización micorrizica y su efecto sobre los

componentes del rendimiento y el contenido de fósforo en frijol común. *Agric. Téc. Méx.* 28(1): 23-33.

Aguirre-Medina, J. F., A. Mendoza-López, J. Cadena-Iñiguez, y C. H. Avendaño-Arrazate. 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.

- Aguirre-Medina, J. F., D. M. Moroyoqui-Ovilla, A. Mendoza-López, J. Cadena-Iñiguez, C. H. Avendaño-Arrazate, y J. F. Aguirre-Cadena. 2011. Aplicación de *A. brasilense* y *G. intraradices* a *Coffea arabica* en vivero. *Agron. Mesoam.* 22(1): 1-10.
- Allen M. F., T. S. Moore Jr., and M. Christensen. 1982. Phytohormone change in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizal. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Can. J. Bot.* 60: 468-471.
- Andrade, S. A. L., P. Mazzafera, M. A. Schivinato, and A. P. D. Silveira. 2009. Arbuscular mycorrhizal association in coffee. *Review. J. Agric. Sci.* 147: 105-115.
- Barea, J. M., R. Azcon, and C. Azcon-Aguilar. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. General Molecular Microbiol.* 81(1-4): 343-351.
- Clark, R. B., and S. K. Zeto. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J. Plant Nutri.* 23: 867-902.
- Cordero, J., F. Mesen, M. Montero, J. Stewart, D. Boshier, J. Chamberlain, T. Pennington, M. Hands, C. Hughs, y G. Detlefsen. 2003. Descripción de especies de árboles nativos de América Central. *In: Cordero, J., y D. H. Boshier (eds). Árboles de Centroamérica.* Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica. pp: 915-916.
- Cuenca, G., A. Cáceres, G. Oirdobro, Z. Hasmy, y C. Urdaneta. 2007. Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia* 32(1): 23-29.
- Dirzo, R., and M. C. Garcia. 1992. Rates of deforestation in los Tuxtlas and Neotropical area in south east Mexico. *Conservation Biol.* 6: 84-90.
- Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, C. Labandera-Gonzalez, J. Caballero-Mellado, J. F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brener, S. Burdman, D. Kadouri, S. Sarig, and Y. Okon. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Austr J. Plant Physiol* 28: 871-879.
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden, and Y. Okon, 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 107-149.
- Grose, O. S., and R. G. Olmstead. 2007. Taxonomic revisions in the polyphyletic Genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). *Systematic Bot.* 32(3): 660-670.
- Hungria, M., R. J. Campo, E. M. Souza, and F. O. Pedrosa. 2004. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant & Soil* 331: 413-425.
- Irizar-Garza, M. B. G., P. Vargas-Vázquez, D. Garza-García, C. Tut y Couoh, I. Rojas-Martínez, A. Trujillo-Campos, R. García-Silva, D. Aguirre-Montoya, J. C. Martínez-González, S. Alvarado-Mendoza, O. Grajeda-Cabrera, J. Valero-Garza, y J. F. Aguirre-Medina. 2003. Respuesta de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la región central de México. *Agric. Téc. Méx.* 29(2): 213-225.
- Leigh, J., A. Hodge, and A. H. Fitter 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytol.* 181: 199-207.
- Miranda, F. 1976. Vegetación de Chiapas 2ª parte. 2da Ed. Gobierno del Estado de Chiapas. México. pp: 168-169.
- Parra, M. P., M. Sánchez, y E. Sieverding. 1990. Efecto de la micorriza vesículo-arbuscular en café (*Coffea arabica* L.) variedad Colombia en almacigo. *Acta Agron.* 40: 88-99.
- Phillips, J. M., and D. J. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Reis-Junior, F. F., M. F. Silva, K. R. S. Teixeira, S. Urquiaga, e V. M. Reis, 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum* Amazonense associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R. Bras. Ci. Solo* 28: 103-113.
- Roberts, M. J., S. P. Long, L.L. Tieszen, y C. L. Beadle. 1988. Medición de la biomasa vegetal y de la producción primaria neta. *In: Coombs J., D. O. Hall, S. P. Long, y J. M. Scurloch (eds). Técnicas de Fotosíntesis y Productividad.* Colegio de Postgraduados, Chapingo, Estado de México. pp: 1-16.
- Ruiz-Torres, G., G. Zavala-Mata, y J. F. Aguirre-Medina. 2005. La inoculación de *Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit con *Glomus intraradices* Schenk et Smith y *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Dobereiner y su efecto en la producción de materia seca. Memoria del primer simposio internacional de forrajes tropicales en la producción animal. Tuxtla Gutiérrez. Chiapas. 155 p.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México, D.F. 182 p.
- Sánchez, C., E. Montilla, R. Rivera, y R. Cupull. 2005. Comportamiento de 15 cepas de hongos micorrizogenos (HMA) sobre el desarrollo de posturas de cafeto en un suelo pardo gleyzoso. *Rev. For. Latinoam.* 38: 83-95.
- Schweiger, P., and I. Jakobsen. 2000. Laboratory and field methods for measurement of hyphal uptake of nutrients in soil. *Plant and Soil* 226: 237-244.
- Siqueira, J. O., O. J. Saggin-Junior, W. W. Flores-Aylas, and P. T. G. Guimaraces. 1998. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza* 7: 293-300.
- Zambrano, J. A., y A. D. Lucía. 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.