

Efecto de uso del suelo bajo un sistema silvopastoril estrella (*Cynodon plectostachyus*) y leucaena (*Leucaena leucocephala*) sobre las simbiosis (*Rhizobium*, *Micorrizas*)

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Jossué Isaac Vargas-Sanjur¹, Julián Estrada-Álvarez², Carmen S. Morales-Londoño³

¹ Estudiante Maestría en Sistemas de Producción Agropecuaria. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

² Departamento de Producción Agropecuaria. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

³ Departamento de Desarrollo Rural. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

jestrada@ucaldas.edu.co

(Recibido: julio 15, 2013 Aprobado: agosto 09, 2013 Actualizado: diciembre 20, 2013)

RESUMEN: Se evaluó el efecto de la asociación *Leucaena leucocephala* - *Cynodon plectostachyus* de 13 años de establecida, sobre la efectividad en la nodulación de *Rhizobium* en leucaena y su asociación con micorrizas. La pradera se estableció en la granja Montelindo; ubicada a 75°45' longitud oeste y 5°04' latitud norte (Palestina, Caldas) a 1050 m y 24C°. La evaluación del *Rhizobium* se determinó de acuerdo con cantidad, color y diámetro de nódulos fijadores de nitrógeno; para las micorrizas se realizó la tinción de raíces para la identificación de esporas efectuando su comparación con la base de datos INVAM (*International Culture Collection of VA Mycorrhizal Fungi*). La pradera a evaluar consta de 4 lotes de 1 ha (4 franjas por lote en una rotación 10/30); las muestras se tomaron entre 0 y 4, 4 y 8, 8 y 12, 12 y 16, 16 y 20 cm con un barreno sección redonda de acero inoxidable de 3". Se identificaron en todas las profundidades analizadas la presencia de nódulos fijadores (cantidad, color y diámetro) sin encontrarse diferencias significativas ($p > 0,05$) a las cinco profundidades evaluadas, excepción para diámetro entre 12 y 16 cm de profundidad, el cual fue altamente significativo ($p \leq 0,01$). Para micorrizas se encontró presencia del genero *Glomus* a las cinco profundidades. Se concluyo que en los 13 años de la asociación, se conserva la calidad del suelo mediante la asociación, dada la alta efectividad de la nodulación, presencia de micorrizas y la gran tasa de crecimiento, vigor y capacidad de recuperación de la leucaena.

Palabras clave: bacterias nitrificantes, micorrizas, microbiología de suelos

Effects of soil use under an AficanStar (*Cynodon plectostachyus*) system and leucaena (*Leucaena leucocephala*) trees on the (*Rhizobium*, *Mycorrhiza*) symbiosis

ABSTRACT: The 13 years established association *Leucaena leucocephala*- *Cynodon plectostachyus* effect on the *Rhizobium* on leucaena nodulation effectiveness and its association with mycorrhizal was evaluated. The grassland was established in the Montelindo farm located at 75°45' west and 5°04' North (Palestina, Caldas) at 1,050 m and 24°C. The evaluation of *Rhizobium* was determined according to amount, color and diameter of nitrogen fixing nodules; for mycorrhizal the staining of the roots was performed for identification of spores through a comparison with the IMVAM (*International Culture Collection of VA Mycorrhizal Fungi*) database. The grassland to be evaluated was divided into 4 plots of 1ha each (4 strips per plot in a 10/30 rotation); the samples were taken from 0 to 4, 4 to 8, 8 to 12, 12 to 16, 16 to 20 cm with a 3 inches stainless steel bore. The presence of nitrogen-fixing nodules (number, color and diameter) was identified at all depths tested without significant differences ($p > 0.05$) to the five different depths, except for the diameter between 12 to 16 cm deep which was highly significant ($p \leq 0.01$). The presence of the genus *Glomus* was found for mycorrhizae at the five depths. It was concluded that in the 13 years of the association, the quality of the soil is preserved the association because of the high effectiveness of nodulation, the mycorrhizal presence and the high rate of growth, vigor and recovery capacity of leucaena.

Key words: nitrifying bacteria, mycorrhizae, microbiology, mycorrhizas

Introducción

La intensificación de la producción agropecuaria ha ido acompañada de un gran aumento de la fertilización con nitrógeno (N) y fósforo (P) a nivel mundial; los cultivos absorben los nutrientes de los fertilizantes de manera limitada, la mayoría del N se pierde por lixiviación y volatilización y el P se pierde por fijación; Matson et al. (1997) estiman que alrededor del 40 al 60% del N que se aplica a los cultivos queda en los suelos o se pierde por lixiviación. La lixiviación de nitratos del suelo a los sistemas de abastecimiento de agua produce un aumento de su concentración en el agua y la contaminación de los sistemas de abastecimientos superficiales y subterráneos, lo cual se convierte en una amenaza para la salud humana y para los ecosistemas naturales.

El plan 2019 de FEDEGAN (Federación Colombiana de Ganaderos, 2006), propone aumentar la productividad en la ganadería bovina a través de alternativas eficientes de producción, en la mitad del área que actualmente ocupa la ganadería. Una buena opción tecnológica para la ganadería colombiana son las asociaciones gramíneas-leguminosas, ya

que al ser las leguminosas fijadoras de N brindan a las gramíneas un aporte mayor de este y aumentan su productividad (Cardona, 1995; Cardona & Suárez, 1997).

Por las razones expuestas, el desarrollo pecuario en América tropical debe estar orientado a incrementar la producción bovina a una tasa que le permita cubrir la demanda de alimentos para una población que crece aceleradamente, rehabilitar las pasturas degradadas, prevenir el deterioro de los recursos naturales y asegurar que los productores locales puedan competir con ventaja ante la apertura de mercados (Ibrahim et al., 2000).

Se estima que la *Leucaena leucocephala*, inoculada con *Rhizobium*, aumenta la productividad de la gramínea asociada; puesto que ella contribuye con el 60 a 80% de la fijación biológica de N, permitiendo que la asociación crezca sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos (Cuadrado et al., 2009). En una investigación realizada en Venezuela por Camacaro et al. (2004), se encontró que la densidad de leucaena es importante para la fijación de N, sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre 4000 y 8000 árboles/ha, pero al evaluar las parcelas donde se aplicó N químico, la producción de biomasa en la gramínea fue similar a la cual se le aplicó de 400-800 kg/N/ha/año.

Adicionalmente a los *Rhizobium*, existen otros organismos simbióticos en el suelo como las micorrizas (hongos mutualistas), que establecen asociaciones entre raíces de plantas superiores y el suelo; estos hongos dependen de la planta para el suministro de carbono, energía y un nicho ecológico, a la vez entregan nutrimentos minerales a las plantas (especialmente los poco móviles como el P, por estar acomplejado por el Ca, el Fe y el Al, especialmente en suelos ácidos); así mismo imparten otros beneficios como: sustancias reguladoras de crecimiento, incremento de la tasa fotosintética, ajuste osmótico cuando hay sequía, aumento de la fijación de N por bacterias simbióticas o asociativas, resistencia a plagas y enfermedades, mejoras a la agregación del suelo y mediación en muchas de las acciones de interacciones de la microflora y microfauna, que ocurren en el suelo alrededor de las raíces (Bethlenfalvay & Linderman, 1992; Sánchez, 1999).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del uso del suelo utilizado, bajo un sistema silvopastoril (*Cynodon plectostachyus* - *Leucaena leucocephala*) después de 13 años de establecido, sobre la nodulación por *Rhizobium* y la presencia de micorrizas.

Materiales y Métodos

El experimento se realizó en la granja Montelindo de la Universidad de Caldas, ubicada a 75°45' longitud oeste y 5°04' latitud norte (Palestina, Caldas) a 1050 m y 24°C de temperatura media. Las muestras recolectadas se procesaron en los laboratorios del Instituto de

Biología Agropecuaria de la Universidad de Caldas, en Manizales. En campo se utilizó una pradera establecida en 1999 de 4 ha (16 franjas de 2500 m²) dividido en 4 lotes experimentales de 1 ha (4 franjas por lote en una rotación 10/30); uno en monocultivo de *Cynodon plectostachyus* y tres en asociación (*Leucaena leucocephala* - *Cynodon plectostachyus*) con una densidad inicial de 10000 árboles/ha. Desde finales de 1999 estos lotes han sido sometidos a pastoreo directo en ramoneo, con bovinos comerciales tipo carne, con una carga equivalente por año entre 1750 a 2000 kg de peso vivo. Al momento de la siembra se aplicaron al suelo 200 kg/ha de roca fosfórica, además las semillas de leucaena fueron inoculadas con *Rhizobium* específico (cepa 4872 CIAT) y la micorriza se aplicó 30 g/árbol a los 45 días de la siembra, al momento de trasplantarlos al lote. Durante los 13 años de pastoreo se han aplicado 4 ton de gallinaza/ha al voleo a intervalos de 3 años.

El muestreo para la determinación de *Rhizobium* y micorriza se realizó solo en los tres lotes asociados (12 franjas de 2500 m²), donde se seleccionaron aleatoriamente cuatro plantas de leucaena (*L. leucocephala*) por franja a muestrear (12 muestras a 5 profundidades).

La metodología utilizada para la determinación de *Rhizobium* fue la propuesta por Bradley & Nolt (1988), que consiste en realizar perforaciones al suelo con la ayuda de un barreno de acero inoxidable sección redonda (3" de diámetro), el cual es introducido a golpe de martillo, separado a 10 cm del fuste de la planta. El barreno posee varias aberturas laterales, las cuales indican cinco profundidades: 0, 4, 8, 12, 16 y 20 cm (Figura 1).



Figura 1. Barreno de acero inoxidable con las cinco profundidades (cada 4 cm).

Las muestras de suelo tomadas a las cinco profundidades fueron guardadas en bolsas plásticas debidamente rotuladas para su posterior análisis en el laboratorio; ellas fueron evaluadas tomando en cuenta características como: cantidad de nódulos presente en cada profundidad, diámetro del nódulo y color interno (Figura 2).



Figura 2. Toma de muestra con el barreno a 10 cm del fuste del árbol.

La evaluación del color interno del nódulo se realizó a través de un corte transversal; tonalidades rojizas determinan fijación de N activa; tonalidades blancas representan actividad no funcional, los nódulos rotos o vacíos no fueron tomados en cuenta.

Para la determinación de micorrizas se utilizó la técnica de tinción propuesta por Grace & Stribley (1991); el principio de esta técnica consiste en el aclaramiento del citoplasma y núcleo de las células de la raíz con una solución de KOH al 10%, y luego acidificarlas con HCl al 10%, para su posterior tinción. La técnica clásica de tinción con azul de tripano, se reemplazó por azul de metileno, y se modificó el tiempo de tinción, lo cual no afectó los resultados (Tabla 1).

Tabla 1. Tiempos utilizados para la tinción

Metodologías	Tiempo en KOH	Tiempo en HCL	Tiempo de tinción	Retiro de tinción
(Grace & Stribley, 1991)	24-48 h/60°C	2-3 min/T°amb.	8h/ 60°C	Acido láctico
Modificaciones	1 h/90°C	1 h/T°amb.	1h/T°amb.	Agua

Posterior a la tinción, las muestras fueron montadas en láminas portaobjetos para su observación en un microscopio utilizando un aumento de 40x.

Los resultados experimentales fueron analizados utilizando el paquete estadístico STATA® V 2012.

Resultados y Discusión

Para el caso de los nódulos (*Rhizobium*), no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las cinco profundidades estudiadas, tanto para la cantidad, como para el color; sin embargo, al analizar las diferentes profundidades en los tres lotes bajo sistema silvopastoril, se visualizaron algunas tendencias, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Determinación de número, color y diámetro de los nódulos a cinco profundidades en tres lotes

Tratamiento	Profundidad	Número de nódulos	Color de nódulos	Diámetro de nódulos
A	0-4	35	0,94	1,71
	4-8	35	1,71	1,99
	8-12	15	1,41	2,08
	12-16	5	2,14	1,24
	16-20	23	1,45	1,74
B	0-4	24	1,61	1,64
	4-8	17	2,50	3,33
	8-12	9	1,62	1,95
	12-16	0	0,00	0,00
	16-20	3	1,58	2,25
C	0-4	4	0,48	1,19
	4-8	5	1,41	1,33
	8-12	2	1,53	1,63
	12-16	0	0,00	0,00
	16-20	1	0,78	1,00

Color de los nódulos: 1,00 = blancos; 2,00 = marrón; 3,00 = rojizo. Diámetro de los nódulos: 1,00 = 1 a 2 mm; 2,00 = 2 a 3 mm; 3,00 = 3 a 4 mm; 4,00 = 4 a 5 mm; 5,00 = 5 a 6 mm; 6,00 = 6 o más mm.

Estas escalas de colores y diámetro se registraron con base en la metodología propuesta por Bradley & Nolt (1988), como se pueden observar en la Figura 3.

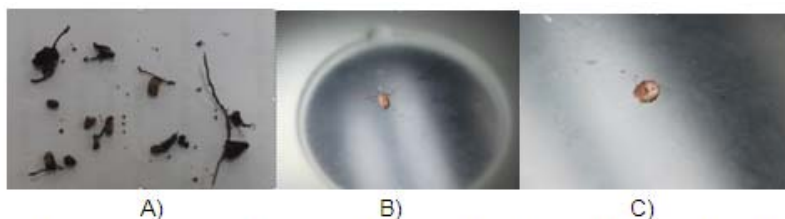


Figura 3. Caracterización y descripción de los nódulos, A) cuantificación de nódulos por profundidad, B) diámetro de cada nódulo y C) color interno del nódulo.

La efectividad en la fijación de nitrógeno se expresa en el color del nódulo ya que los de coloración de rosada, roja o marrón indican actividad en la fijación de nitrógeno molecular, en tanto que los de color blanco son inefectivos. Por tanto a las diferentes profundidades evaluadas se observó la mayor actividad del *Rhizobium* entre 12 a 16 cm, seguidas por las profundidades de 4 a 8 y 8 a 16 cm, respectivamente

En el análisis estadístico en la determinación del diámetro del nódulo, se encontró una diferencia altamente significativa ($p \leq 0,01$) entre los 12 y 16 cm, respecto a las demás profundidades analizadas. Lo anterior concuerda con investigaciones realizadas por Sánchez & Urdaneta (1997), quienes encontraron abundante nodulación hasta 1,5 m de profundidad y el tamaño predominante fue de 1 a 1,9 mm.

En todas las muestras analizadas a las cinco profundidades, se encontró presencia de micorrizas en las raíces secundarias (Tabla 3), estas se identificaron como esporas del género *Glomus*, con densidad entre 60 y

85 esporas por 50 g de suelo, indicando la efectividad de la simbiosis. Este resultado concuerda con los trabajos expuestos por autores como Rey et al. (2005), Flores et al. (2008), quienes encontraron que especies del género *Glomus* son las que expresan mejor la simbiosis en leucaena, aunque ellos reportan entre 66 y 104 esporas por gramo de suelo a 120 días de inoculación en condiciones de vivero; por tanto, se considera que la actividad de las micorrizas en campo es muy buena y efectiva (Figura 4).

Tabla 3. Distribución de características de nódulos por profundidades

Profundidad	Cantidad	Color	Diámetro
0-4	20,60	2,06	2,60
4-8	18,40	2,30	2,40
8-12	7,86	2,20	2,40
12-16	1,50	1,60	1,20**
16-20	8,8	1,8	2,3

NS: Efecto no significativo ($p > 0,05$); * Efecto significativo ($p \leq 0,05$); ** Efecto altamente significativo ($p \leq 0,01$).

Color de los nódulos: 1,00 = blancos; 2,00 = marrón; 3,00 = rojizo.

Diámetro de los nódulos: 1,00 = 1 a 2 mm; 2,00 = 2 a 3 mm; 3,00 = 3 a 4 mm; 4,00 = 4 a 5 mm; 5,00 = 5 a 6 mm; 6,00 = 6 o más mm.



Figura 4. Raicillas secundarias para coloración y placas para observación de colonización por micorrizas en plantas de leucaena.

Conclusiones

Al cabo de 13 años de establecida la asociación, se ha mantenido la misma carga animal (1750 a 2000 kg/ha), con excelentes ganancias de peso en los animales (4,5 kg/ha/día vs 3,0 kg/ha/día en monocultivo), lo cual lleva a concluir que el sistema silvopastoril leucaena-pasto estrella mantiene activas la simbiosis con *Rhizobium* y micorrizas y reiteran la conservación de la calidad y capacidad productiva de los suelos, gracias a la asociación leguminosa gramínea.

Se ratifica que estos dos microorganismos del suelo son grandes aportantes de nutrientes para el suelo y la planta, con una alta efectividad sobre la estabilidad de la pastura y su aprovechamiento por parte del animal en pastoreo.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas y al Instituto de Biotecnología Agropecuaria por el apoyo financiero del proyecto código 0613712.

Referencias bibliográficas

Bethlenfalvay, G.J.; Linderman, R.G. Preface. In Mycorrhizae in sustainable agriculture. Ed. by - G.J. Bethlenfalvay & R. G. Linderman. Madison, Wisconsin, USA. **ASA Special Publication**, n.54. p.45-70, 1992.

Bradley, S; Nolt, K. Simbiosis leguminosa-rizobio. **Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico**. CIAT (Proyecto especial CIAT-UNDP). (Edición Técnica) Cali, Colombia. 1988. 178p.

Camacaro, S.; Garrido, J.C.; Machado, W. Fijación de nitrógeno por *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium* y *Albizia lebbek* y su transferencia a las gramíneas asociadas. **Zootecnica tropical**, v.22, n.1, 2004.

Cardona, M.C. Producción de carnes en pasturas asociadas en la zona cafetera. En: **Curso manejo de praderas, forrajes y recursos naturales tropicales**. Fundación CICADEP. Proyecto Colombo – Alemán. CORPOICA – GTZ. Pereira.1995.

Cardona, M.C.; Suárez, S. Potencial de la producción de carne y leche en pasturas solas y asociadas con leguminosas adaptadas a la zona cafetera. **Avance técnico, CENICAFÉ**, n.244, 4p., 1997.

Cuadrado, B.; Rubio, G.; Santos, W. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Brandyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. **Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacología**, v.38, n.1, p.78-104, 2009.

FEDEGAN (Federación Colombiana de Ganaderos). **Plan estratégico de la ganadería colombiana**. FEDEGAN-FNG. 294p. 2006.

Flores-Bello, M.R.; Espinosa, S.; García-Calvario, R.; Zamora-Cruz, A.; Farias-Larios, J.; López-Aguirre, J.G. Inoculación con hongos micorrícicos arbusculares y el

crecimiento de plántulas de leucaena. **Terra latinoamericana**, v.26, n2, p.127-131, 2008.

Grace, C.; Stribley, D.P. A safer procedure for routine staining of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v.95, p.1160-1162, 1991.

Ibrahim, M.; Camero, A.; Camargo, J.C.; Andrade, H.J. **Sistemas silvopastoriles en América Central: Experiencias de CATIE**. 2000. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A6121E/A6121E.PDF>. Accesado en: 13/05/2012.

International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM). **Classification of Glomeromycota**. Available via DIALOG. 1998. Disponible en: <http://www.invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/classification.htm>. General description. Accesado en: 3/05/2013.

Matson, P.A.; Parton, W.J.; Power, A.G.; Swift, M.J. Agricultural intensification and ecosystem properties. **Science**, v.277, n.5325, p.504-509, 1997.

Rey, A.; Chamorro, D.; Ramírez, M. Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad del forraje de *Leucaena leucocephala*. **Revista Corpoica**, v.6, n.2, p.52-59, 2005.

Sánchez, M. **Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos**. Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira. Ed. Feriva S.A. 237p. 1999.

Sánchez, M.; Urdaneta, F. Contribución y uso de fijadores de nitrógeno y micorrizas en la productividad y sostenibilidad del suelo. Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira. **Boletín Técnico**, v.7, p.27-44, 1997.

STATA. **Data Analysis and Statistical Software for Professionals**. Stata Corp. USA. 2012.

Vargas-Sanjur, J.I.; Estrada-Álvarez, J.; Morales-Londoño, C.S. Efecto de uso del suelo bajo un sistema silvopastoril estrella (*Cynodon plectostachyus*) y leucaena (*Leucaena leucocephala*) sobre las simbiosis (*Rhizobium*, Micorrizas). **Veterinaria y Zootecnia**, v.7, n.2, p.x-x, 2013.