



Artículo / Article

## Crecimiento de *Tabebuia donnell-smithii* Rose inoculada con hongos micorrizogenos arbusculares y rizobacterias

### Growth of *Tabebuia donnell-smithii* Rose inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria

Juan Francisco Aguirre-Medina<sup>1</sup>, Juan Francisco Aguirre-Cadena<sup>2</sup>, Miguel Antonio Ramón-Castro<sup>1</sup>

#### Resumen

*Tabebuia donnell-smithii* es un árbol maderable con importancia económica y ecológica en las regiones tropicales de México, cuyas poblaciones naturales han disminuido, debido, entre otras razones, a su lento crecimiento durante su establecimiento. Se investigó en plantas de *Tabebuia* el efecto en su crecimiento y nutrición de la inoculación con *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. El hongo y las bacterias se aplicaron a las semillas en combinaciones de dos o tres de los siguientes microorganismos: *A. brasilense*  $9 \times 10^6$  UFC g de turba<sup>-1</sup>, *R. intraradices* con 40 esporas g de suelo estéril<sup>-1</sup> y raíces colonizadas al 95 % y *P. fluorescens* con  $9 \times 10^6$  UFC g de turba<sup>-1</sup> más el testigo. Se sembraron en macetas con una mezcla no estéril de suelo Andosol mólico y arena de río lavada, 1:1(v/v). En total se establecieron cinco tratamientos, con cinco repeticiones distribuidas en un diseño completamente al azar. Se realizaron cinco muestreos destructivos: el primero a los 45 días después de la siembra y los siguientes cada 28 días. Se registraron variables morfológicas y fisiológicas del rendimiento. Los tratamientos incrementaron el crecimiento de las plantas, con excepción de las dos bacterias juntas después de 158 días. El correspondiente a *P. fluorescens* - *R. intraradices* y el de los tres microorganismos indujeron más biomasa en el mayor número de componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento. El contenido más alto de N y P en el tejido vegetal se obtuvo con los tres microorganismos y con la combinación *R. intraradices* - *A. brasilense*.

**Palabras clave:** *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner, biomasa aérea, biomasa radical, inoculación, *Pseudomonas fluorescens* Migula, *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schuessler.

#### Abstract

*Tabebuia donnell-smithii* is a timber tree with economic and ecological importance in the tropical regions of Mexico, whose natural populations have declined, due, among other reasons, to its slow growth during its establishment. The effect on their growth and nutrition of the inoculation with *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* was investigated in *Tabebuia* plants. The fungus and bacteria were applied in the seeds in combinations of two or three of the following microorganisms: *A. brasilense*  $9 \times 10^6$  UFC g of peat<sup>-1</sup>, *R. intraradices* with 40 spores g of sterile soil<sup>-1</sup> and roots 95 % colonized and *P. fluorescens* with  $9 \times 10^6$  UFC g of peat<sup>-1</sup> plus the control. They were sown in pots with a non-sterile mixture of Molic andosol soil and washed river sand, 1: 1 (v / v). In total, five treatments were established, with five replications distributed in a completely randomized design. Five destructive samplings were carried out: the first one at 45 days after sowing and the next every 28 days. Morphological and physiological yield variables were recorded. Treatments increased plant growth, with the exception of the two bacteria together after 158 days. The corresponding to *P. fluorescens* - *R. intraradices* and that of the three microorganisms induced more biomass in the greater number of morphological and physiological components of yield. The highest content of N and P in plant tissue was obtained with the three microorganisms and with the combination *R. intraradices* - *A. brasilense*.

**Key words:** *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner, aerial biomass, root biomass, inoculation, *Pseudomonas fluorescens* Migula, *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schuessler.

Fecha de recepción/ Reception date: 12 de junio de 2015; Fecha de aceptación/Acceptance date: 6 de julio de 2015.

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía. UNACH. Huehuetán, Chiapas.México. Correo-e: juanf56@prodigy.net.mx

<sup>2</sup> Colegio de Postgraduados. Campus Puebla. México.

## Introducción

La interacción entre los componentes de una comunidad microbiana en los sistemas agroforestales puede manifestarse o no, en algún atributo morfológico o fisiológico de interés antropocéntrico de la planta hospedante, especialmente, en sistemas de producción sustentables o de bajos insumos, pero su incidencia efectiva depende del microorganismo, de las condiciones ambientales y edáficas (Qiu *et al.*, 2008). Algunas bacterias y hongos que viven en la porción de suelo influenciado por las raíces estimulan el crecimiento de los vegetales e inducen efectos positivos en su desarrollo y supervivencia (Artursson *et al.*, 2006). Por ejemplo, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y los hongos micorrizógenos arbusculares (MA), que representan dos de los principales grupos de microorganismos benéficos de la rizosfera.

La inoculación con más de un microorganismo a la semilla o al suelo puede poner a disposición de la planta hospedante diversos mecanismos de acción para abastecerse de nutrientes y agua. Varios estudios han demostrado que la inoculación con hongos y bacterias produce un efecto sinérgico (Diouf *et al.*, 2005; Lalitha *et al.*, 2011), aunque en otros casos, no necesariamente induce un efecto aditivo o sinérgico en la planta hospedante (Trabelsi y Mhamdi, 2013).

En México, se han documentado incrementos en el rendimiento y sus componentes en cultivos anuales al inocular hongos (MA) y bacterias fijadoras de nitrógeno bajo condiciones de campo (Aguirre-Medina, 2006). En cultivos perennes, como *Theobroma cacao* L. en vivero, Aguirre-Medina *et al.* (2007) citan mayor desarrollo vegetal cuando se incorporan juntos *R. intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schuessler y *A. brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner. En *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner, el número de hojas y la biomasa del tallo fue superior cuando se usan por separado (Aguirre-Medina *et al.*, 2011).

Los microorganismos inducen aumentos en el crecimiento en menor tiempo en las plantas producidas en vivero, y, en consecuencia, disminuyen el lapso necesario antes de su trasplante en el campo. Esta ventaja se pretende estudiar en *Tabebuia donnell-smithii* Rose (primavera); árbol caducifolio de regiones tropicales y subtropicales de México (Miranda, 1998), cuya madera tiene alta demanda, lo que ha disminuido su abundancia natural, por un aumento en su explotación y regeneración poco exitosa.

Los programas de reforestación en México presentan una supervivencia menor a 50 %, debido, en parte, a la baja calidad de las plantas producidas en vivero y la sequía intermitente que ocurre todos los años (Semarnat, 2010). Bajo estas condiciones, es posible que los microorganismos ayuden a la supervivencia de las plantas en condiciones ambientales adversas (Andrade *et al.*, 2009).

## Introduction

The interaction between the elements of a microbe community in the agroforestry systems may or may not become apparent, in some morphological or physiological feature of the host plant of anthropocentric interest, particularly, in sustainable productivity systems or of low income, but its effective incidence depends on the microorganisms, of the environmental and soil conditions (Qiu *et al.*, 2008). Some bacteria and fungi live in the section of the ground influenced by the roots, they stimulate growth of vegetals and induce positive effects in their development and survival (Artursson *et al.*, 2006). For example, by promoting rhizobacteria of vegetal growth and the arbuscular mycorrhizal fungi (MA) that represent two of the most important groups of beneficiary microorganisms of the rhizosphere.

Inoculation with more than one microorganism to the seed or to the soil can make available to the host plant various mechanisms of action to supply nutrients and water. Several studies have shown that inoculation with fungi and bacteria produces a synergistic effect (Diouf *et al.*, 2005; Lalitha *et al.*, 2011), but in other cases it does not necessarily induce an additive or synergistic effect on the host plant (Trabelsi and Mhamdi, 2013).

In Mexico, increases in yield and their components in annual crops have been documented when inoculating fungi (MA) and nitrogen fixing bacteria under field conditions (Aguirre-Medina, 2006). In perennial crops such as *Theobroma cacao* L. in nursery, Aguirre-Medina *et al.* (2007) cite greater plant development when *R. intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schuessler and *A. brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner were incorporated together. In *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner, leaf number and stem biomass were superior when used separately (Aguirre-Medina *et al.*, 2011).

Microorganisms induce increments in growth in shorter time in plants grown at the nursery, and, in consequence, diminish the necessary lapse before they are transplanted to the field. It is pretended to study this advantage on *Tabebuia donnell-smithii* Rose (Primavera), a deciduous tree from tropical and subtropical regions of Mexico (Miranda, 1998), that has a highly demanded timber, which has turned into a reduction of its natural abundance, from a greater harvesting and a rather unsuccessful regeneration.

The reforestation programs in Mexico show a survival under 50 %, partly from a poor quality of the plants grown at the nursery and the interrupting drought that occurs every year (Semarnat, 2010). In such conditions, it is possible that microorganisms help in plant survival when adverse environmental conditions prevail (Andrade *et al.*, 2009).



Los hongos (MA) incrementan la absorción de nutrientes, especialmente de fósforo (Richardson *et al.*, 2009), e inducen tolerancia al estrés hídrico (Sylvia, 2005). *Azospirillum* incrementa el desarrollo radical de la planta hospedante, mediante la producción de hormonas y la fijación de nitrógeno (Bashan y De Bashan, 2010); y *P. fluorescens* Migula estimula el crecimiento de las plantas y solubiliza minerales (Lucy *et al.*, 2004).

En este contexto, el objetivo de la presente investigación fue determinar la asignación de materia seca en *Tabebuia donnell-smithii* en interacción con la inoculación de *Rhizophagus intraradices*, *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum brasilense*, y su efecto en la concentración de nitrógeno y fósforo en el tejido vegetal.

## Materiales y Métodos

### Localización geográfica y condiciones ambientales del sitio experimental

La investigación se desarrolló (febrero a noviembre del 2013) en un vivero del Campo Experimental Rosario Izapa-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el km 18 de la carretera Tapachula-Cacaohatan, municipio Tuxtla Chico, Chiapas; con coordenadas son 14°40' N y 92° 10' O, a 435 msnm. En este lugar se colectaron las semillas de *T. donnell-smithii* de árboles de copa densa, fuste recto y sin presencia de daños por plagas y enfermedades. El clima en la zona es cálido húmedo con lluvias en verano e influencia de monzón. La precipitación promedio es de 4 720 mm anuales y la temperatura media, considerada isotermal, de 25.4 °C.

### Análisis físicos y químicos del sustrato

El sustrato se conformó con una mezcla de suelo Andosol mólico y arena de río lavada, 1:1 (V/V), cuyas características fueron textura arena-migajonosa (Bouyucos) (80.66 % de arena, 16.36 % de limo, 2.98 % de arcilla), porosidad (34 %), densidad real (209 g mL<sup>-1</sup>); densidad aparente (1.38 g mL<sup>-1</sup>); 3.1 % materia orgánica (Walkley-Black); 0.12 dsm<sup>-1</sup>, conductividad eléctrica; pH 5.71; 0.19 % N (Kjeldhal); 5.0 ppm P (colorimetría); 18.5 ppm K<sup>++</sup> (espectrofotometría atómica); 59 ppm Ca<sup>++</sup> (espectrofotometría atómica); 8.1 ppm Mg<sup>++</sup>; y 5 Meq 100g<sup>-1</sup> de capacidad de intercambio catiónico. Con el sustrato sin esterilizar se llenaron bolsas de plástico negro (calibre 700), con una capacidad de 5 kg de suelo por bolsa, y se perforaron en la parte inferior para favorecer el drenaje.

Fungi (MA) increase nutrient absorption, phosphorous in particular (Richardson *et al.*, 2009), and they induce tolerance to water stress (Sylvia, 2005). *Azospirillum* stimulates root development of the host plant, through hormones and nitrogen fixing (Bashan and De Bashan, 2010); and *P. fluorescens* Migula stimulates plant growth and makes minerals, soluble (Lucy *et al.*, 2004).

In this context, the aim of the actual study was to determine the allocation of dry matter of *Primavera* interacting with the inoculation of *Rhizophagus intraradices*, *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum brasilense*, and its effect over the nitrogen and phosphorous concentration in vegetal tissue.

## Materials and Methods

### Location and environment of the experimental site

The actual research took place (February to November 2013) at a nursery of the Experimental Station Rosario Izapa which belongs to the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), located at 18 km of the Tapachula-Cacaohatan highway in the municipality of Tuxtla Chico, Chiapas State between 14°40' N and 92° 10' W at 435 masl. In this place the seeds of *T. donnell-smithii* seeds were collected which came from a dense crown, straight stem and without any signs of plagues or disease. The weather is humid warm in summer and with a monsoon influence. The average precipitation is 4 720 mm a year and the mean temperature, isothermal, of 25.4 °C.

### Substrate physical and chemical analysis

The substrate was formed with a mixture of Molic andosol soil and washed river sand, 1: 1 (V / V), whose characteristics were sand-shallow texture (Bouyucos) (80.66 % sand, 16.36 % silt, 2.98 % clay), porosity (34 %), real density (209 g mL<sup>-1</sup>); bulk density (1.38 g mL<sup>-1</sup>); 3.1 % organic matter (Walkley-Black); 0.12 dsm<sup>-1</sup>, electrical conductivity; pH 5.71; 0.19 % N (Kjeldhal); 5.0 ppm P (colorimetry); 18.5 ppm K<sup>++</sup> (atomic spectrophotometry); 59 ppm Ca<sup>++</sup> (atomic spectrophotometry); 8.1 ppm Mg<sup>++</sup>; and 5 Meq 100 g<sup>-1</sup> cation exchange capacity. Black plastic bags (700 gauge) were filled with the non-sterile substrate, with a capacity of 5 kg of soil per bag, and were drilled in the lower part to favor drainage.



## Microorganismos e inoculación

Los microorganismos que se utilizaron fueron *Rhizophagus intraradices*, producido en el Campo Experimental Rosario Izapa-INIFAP. El inóculo contenía 40 esporas por gramo de suelo estéril y raíces de *Brachiaria decumbens* L., con 95 % de colonización. *Azospirillum brasilense* fue adquirido en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con  $9 \times 10^6$  bacterias g de turba<sup>-1</sup>. *Pseudomonas fluorescens* fue proporcionada por el Campo Experimental Celaya- INIFAP, con  $9 \times 10^6$  bacterias g de turba<sup>-1</sup>. Las semillas se germinaron en charolas con el mismo sustrato y se trasplantaron a las macetas con dos hojas verdaderas. Al momento del trasplante se aplicaron, en el hoyo de siembra, 2 g de cada inóculo mezclado de acuerdo al tratamiento.

Los cinco tratamientos se describen a continuación: 1) *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens*; 2) *Rhizophagus intraradices* + *P. fluorescens*; 3) *R. intraradices* + *A. brasilense*; 4) *A. brasilense* + *R. intraradices* + *P. fluorescens*; y 5) Testigo. Se usaron con cinco plantas como repeticiones en un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue una maceta con una planta. Los riegos se hicieron con agua destilada.

## Variables registradas

Se registraron variables morfológicas y fisiológicas del rendimiento con frecuencia de 28 días después de la siembra (dds); a partir del primer muestreo a los 46 dds, y los siguientes a los 74, 102, 130 y 158 dds. La colonización radical y el contenido de N y P en tejido vegetal se registraron al final del estudio.

La materia seca de la parte aérea y radical de la planta se determinó en estufa de aire forzado por 72 h a 75-80 °C (Sheldon, VWR 1390FM, USA) y los componentes del rendimiento se pesaron en báscula semianalítica (Ohaus, Adventurer Pro, USA).

El área foliar (cm<sup>2</sup>) se obtuvo con un integrador de área foliar (LI-COR, LI 3000A, USA).

Mediante la técnica de tinción y clareo de Phillips y Hayman (1970) se prepararon 100 segmentos de raíz, con longitud de 1.5-1.6 cm de cada muestreo y se observaron al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100 X). Los resultados se expresaron en porcentaje de colonización micorrízica.

Finalmente, los contenidos de N (Micro-Kjeldahl) y P se cuantificaron en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, modelo 400  $\frac{1}{2}$ ).

## Microorganisms and inoculation

The microorganisms that were used were *Rhizophagus intraradices* produced in the Rosario Izapa Experimental Station of INIFAP. The inoculum contained 40 spores per gram of sterile soil and *Brachiaria decumbens* L. roots with 95 % of colonization. *Azospirillum brasilense* was purchased at the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla with  $9 \times 10^6$  bacteria g of peat<sup>-1</sup>. *Pseudomonas fluorescens* Migula, was provided by Celaya Experimental Station of INIFAP, with  $9 \times 10^6$  bacteria g of peat<sup>-1</sup>. Seeds were germinated in trays with the same substrate and were transplanted to pots with two real leaves. At the time of transplantation, in the sowing hole were applied 2 g of inoculum mixed according to the treatment.

The five treatments are described as follows: 1) *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens*; 2) *Rhizophagus intraradices* + *P. fluorescens*; 3) *R. intraradices* + *A. brasilense*; 4) *A. brasilense* + *R. intraradices* + *P. fluorescens*; and 5) Control. They were used with five plants as replications in a completely at random design. The experimental unit was a pot with one plant. Watering was made with distilled water.

## Variables in record

Morphological and physiological yield variables were recorded 28 days after sowing (dds); from the first sampling to 46 dds, and the following to 74, 102, 130 and 158 dds. Root colonization and N and P content in plant tissue were recorded at the end of the study.

The aerial and root dry matter of the plant was determined in a forced air oven for 72 h at 75-80 °C (Sheldon, VWR 1390FM, USA) and the performance components were weighed on a semianalytical scale (Ohaus, Adventurer Pro).

The leaf area (cm<sup>2</sup>) was obtained with a leaf area integrator (LI-COR, LI 3000A, USA).

By the staining and polishing technique of Phillips and Hayman (1970), 100 root segments with a length of 1.5-1.6 cm were prepared from each sample and were observed under optical microscope with immersion objective (100 X). The results were expressed as percentage of mycorrhizal colonization.

Finally, the contents of N (Micro-Kjeldahl) and P were quantified in a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, model 400  $\frac{1}{2}$ ).



**Análisis estadístico**

Los efectos entre tratamientos se estimaron con un análisis de varianza para las variables morfológicas, fisiológicas, el contenido de nitrógeno y fósforo con el procedimiento PROC ANOVA. Posteriormente, se hizo una comparación de medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con el programa computacional *Statistical Analysis System*, versión 8.1 (SAS, 1999-2000).

**Resultados y Discusión**

**Altura y área foliar**

Los resultados de los diferentes tratamientos se presentan en el Cuadro 1. La inoculación combinada de *R. intraradices*, *A. brasilense* y *P. fluorescens* aumentó significativamente todos los parámetros de crecimiento.

**Statistical analysis**

The effects between treatments were estimated with an analysis of variance for the morphological, physiological variables, the nitrogen and phosphorus content with the PROC ANOVA procedure. Subsequently, a comparison of means (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) was done with the *Statistical Analysis System*, version 8.1 (SAS, 1999-2000).

**Results and Discussion**

Table 1 shows the results of the different treatments. The *R. intraradices*, *A. brasilense* and *P. fluorescens* combined inoculation significantly increased all the growth parameters.



Cuadro 1. Altura, área foliar y peso seco de raíz y vástago de las plantas de *Tabebuia donnell-smithii* Rose.

Tiempo (dds)	Tratamientos	Altura (cm planta <sup>-1</sup> )	Área foliar (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	Peso seco (g planta <sup>-1</sup> )	
				Raíz	Vástago
46	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	3.16 ± 0.07 b*	4.16 ± 0.29 b	0.010 ± 0.0005ab	0.019 ± 0.0009 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	3.38 ± 0.11 ab	3.45 ± 0.18 b	0.009 ± 0.0005 b	0.017 ± 0.0012 b
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	2.56 ± 0.16 c	3.89 ± 0.25 b	0.010 ± 0.0001ab	0.017 ± 0.0006 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	3.86 ± 0.15 a	5.47 ± 0.23 a	0.011 ± 0.0002ab	0.025 ± 0.0010 a
	Testigo	3.52 ± 0.15 ab	5.84 ± 0.24 a	0.011 ± 0.0008 a	0.026 ± 0.0004 a
	CV%	9.2	12.0	10.8	9.8
74	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	5.12 ± 0.29 a	29.02 ± 0.60 b	0.072 ± 0.0028 a	0.137 ± 0.005 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	5.72 ± 0.24 a	27.88 ± 1.13 b	0.055 ± 0.0013 b	0.124 ± 0.003 b
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	4.98 ± 25 a	25.72 ± 0.55 b	0.014 ± 0.0004 d	0.050 ± 0.002 c
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	5.18 ± 0.12 a	43.31 ± 2.47 a	0.040 ± 0.0011 c	0.239 ± 0.004 a
	Testigo	4.19 ± 0.18 a	29.74 ± 1.35 b	0.039 ± 0.0030 c	0.129 ± 0.010 b
	CV%	9.9	10.1	10.2	9.6
102	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	8.70 ± 0.37 c	243.95 ± 4.52 c	0.490 ± 0.011 c	0.708 ± 0.020 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	11.40 ± 0.39 ab	258.56 ± 10.0 bc	0.616 ± 0.017 b	1.317 ± 0.053 a
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	10.92 ± 0.11 b	288.18 ± 9.95 b	0.511 ± 0.004bc	0.769 ± 0.040 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	12.66 ± 0.25 a	438.02 ± 6.78 a	1.237 ± 0.059 a	1.295 ± 0.007 a
	Testigo	8.38 ± 0.50 c	243.95 ± 4.29 c	0.441 ± 0.015 c	0.387 ± 0.013 c
	CV%	7.5	6.1	9.8	8.0

Continúa Cuadro 1...



Continúa Cuadro 1..

Tiempo (dds)	Tratamientos	Altura (cm planta <sup>-1</sup> )	Área foliar (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	Peso seco (g planta <sup>-1</sup> )	
				Raíz	Vástago
130	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	11.80 ± 0.40 c	157.6 ± 4.28 c	0.69 ± 0.01 b	0.790 ± 0.02 d
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	13.80 ± 0.73 ab	326.9 ± 12.29 a	1.29 ± 0.06 a	1.401 ± 0.07 bc
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	12.40 ± 0.24 bc	195.1 ± 4.08 b	0.83 ± 0.01 b	1.502 ± 0.06 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	15.40 ± 0.50 a	303.4 ± 10.62 a	1.15 ± 0.03 a	2.129 ± 0.09 a
	Testigo	11.20 ± 0.37 c	139.6 ± 12.44 c	0.81 ± 0.01 b	1.172 ± 0.01 c
CV%	9.0	9.4	8.4	9.4	
158	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	16.80 ± 0.93 b	729.1 ± 14.2 bc	2.46 ± 0.16 b	4.11 ± 0.07 bc
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	17.70 ± 0.76 b	591.2 ± 27.2 c	3.19 ± 0.02 a	4.77 ± 0.17 ab
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	17.60 ± 0.70 b	727.3 ± 14.1 bc	2.31 ± 0.10 b	3.91 ± 0.26 c
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	21.80 ± 0.66 a	963.6 ± 73.5 a	3.51 ± 0.15 a	4.99 ± 0.08 a
	Testigo	18.20 ± 0.58 b	782.5 ± 20.4 b	2.17 ± 0.08 b	4.05 ± 0.27 bc
CV %	9.8	10.9	9.6	10.0	

dds = Dias después de la siembra; CV = Coeficiente de variación (%).

\*Valores con diferente letra dentro de cada factor y columna son estadísticamente diferentes (p ≤ 0.05).

Table 1. Height, foliar area and dry weight of root and stem of *Tabebuia donnell-smithii* Rose plants.

Time (dds)	Treatments	Height (cm plant <sup>-1</sup> )	Foliar area (cm <sup>2</sup> plant <sup>-1</sup> )	Dry weight (g plant <sup>-1</sup> )	
				Root	Vástago
46	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	3.16 ± 0.07 b*	4.16 ± 0.29 b	0.010 ± 0.0005ab	0.019 ± 0.0009 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	3.38 ± 0.11 ab	3.45 ± 0.18 b	0.009 ± 0.0005 b	0.017 ± 0.0012 b
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	2.56 ± 0.16 c	3.89 ± 0.25 b	0.010 ± 0.0001ab	0.017 ± 0.0006 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	3.86 ± 0.15 a	5.47 ± 0.23 a	0.011 ± 0.0002ab	0.025 ± 0.0010 a
	Control	3.52 ± 0.15 ab	5.84 ± 0.24 a	0.011 ± 0.0008 a	0.026 ± 0.0004 a
CV%	9.2	12.0	10.8	9.8	
74	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	5.12 ± 0.29 a	29.02 ± 0.60 b	0.072 ± 0.0028 a	0.137 ± 0.005 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	5.72 ± 0.24 a	27.88 ± 1.13 b	0.055 ± 0.0013 b	0.124 ± 0.003 b
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	4.98 ± 0.25 a	25.72 ± 0.55 b	0.014 ± 0.0004 d	0.050 ± 0.002 c
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	5.18 ± 0.12 a	43.31 ± 2.47 a	0.040 ± 0.0011 c	0.239 ± 0.004 a
	Control	4.19 ± 0.18 a	29.74 ± 1.35 b	0.039 ± 0.0030 c	0.129 ± 0.010 b
CV%	9.9	10.1	10.2	9.6	
102	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	8.70 ± 0.37 c	243.95 ± 4.52 c	0.490 ± 0.011 c	0.708 ± 0.020 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	11.40 ± 0.39 ab	258.56 ± 10.0 bc	0.616 ± 0.017 b	1.317 ± 0.053 a
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	10.92 ± 0.11 b	288.18 ± 9.95 b	0.511 ± 0.004bc	0.769 ± 0.040 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	12.66 ± 0.25 a	438.02 ± 6.78 a	1.237 ± 0.059 a	1.295 ± 0.007 a
	Control	8.38 ± 0.50 c	243.95 ± 4.29 c	0.441 ± 0.015 c	0.387 ± 0.013 c
CV%	7.5	6.1	9.8	8.0	

Continue Table 1..

Continue Table 1...

Time (dds)	Treatments	Height (cm plant <sup>-1</sup> )	Foliar area (cm <sup>2</sup> plant <sup>-1</sup> )	Dry weight (g plant <sup>-1</sup> )	
				Root	Vástago
130	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	11.80 ± 0.40 c	157.6 ± 4.28 c	0.69 ± 0.01 b	0.790 ± 0.02 d
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	13.80 ± 0.73 ab	326.9 ± 12.29 a	1.29 ± 0.06 a	1.401 ± 0.07 bc
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	12.40 ± 0.24 bc	195.1 ± 4.08 b	0.83 ± 0.01 b	1.502 ± 0.06 b
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	15.40 ± 0.50 a	303.4 ± 10.62 a	1.15 ± 0.03 a	2.129 ± 0.09 a
	Control	11.20 ± 0.37 c	139.6 ± 12.44 c	0.81 ± 0.01 b	1.172 ± 0.01 c
	CV%	9.0	9.4	8.4	9.4
158	<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	16.80 ± 0.93 b	729.1 ± 14.2 bc	2.46 ± 0.16 b	4.11 ± 0.07 bc
	<i>R. intraradices</i> + <i>P. fluorescens</i>	17.70 ± 0.76 b	591.2 ± 27.2 c	3.19 ± 0.02 a	4.77 ± 0.17 ab
	<i>A. brasilense</i> + <i>R. intraradices</i>	17.60 ± 0.70 b	727.3 ± 14.1 bc	2.31 ± 0.10 b	3.91 ± 0.26 c
	<i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	21.80 ± 0.66 a	963.6 ± 73.5 a	3.51 ± 0.15 a	4.99 ± 0.08 a
	Control	18.20 ± 0.58 b	782.5 ± 20.4 b	2.17 ± 0.08 b	4.05 ± 0.27 bc
	CV %	9.8	10.9	9.6	10.0

dds = Days after sowing; CV = Coefficient of variation (%).

Values with different letter within each factor and column are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

Las plantas tuvieron lento crecimiento los primeros 45 dds y, en consecuencia, alcanzaron poca altura. A los 28 días se observó incremento en todos los tratamientos. Esta dinámica se repitió en los siguientes muestreos. Las diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ) correspondieron a los 46, 102, 130 y 158 dds. Entre los 46 y 74 dds, los tratamientos con los microorganismos presentaron mayor altura de planta en comparación al testigo, y los valores promedio variaron de 1.32 cm, con la inoculación de los tres microorganismos, a 2.42 cm en las plantas tratadas con *R. intraradices* y *A. brasilense*.

En todos los casos el siguiente periodo de evaluación, a los 102 dds, se registró incremento en altura de planta: 4.0 a los 7.0 cm; la mayor altura se obtuvo con la inoculación de los tres microorganismos y la menor con las dos bacterias *A. brasilense* y *P. fluorescens* y el testigo. Después del tercer muestreo y hasta el final de la evaluación, las diferencias en altura fueron superiores a 2 cm en los tratamientos con microorganismos, en comparación con el testigo.

En otras especies perennes como *Theobroma cacao*, Aguirre-Medina *et al.* (2007) señalan que a los 120 dds hay diferencias promedio en altura de planta de 9 cm en las inoculadas con *R. intraradices*, en relación con el testigo. Karthikeyan *et al.* (2009) citan aumento en la altura de planta al inocular las semillas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. con *A. brasilense* y *P. fluorescens*; sin embargo, en el presente estudio fue la combinación con menor inducción de altura de planta.

Plants had slow growth the first 45 dds and, consequently, reached low height. At 28 days, an increase in all treatments was observed. This dynamic was repeated in the following samplings. The significant statistical differences ( $P \leq 0.05$ ) corresponded to the 46, 102, 130 and 158 dds. Between 46 and 74 dds, treatments with the microorganisms presented higher plant height compared to the control, and the average values varied from 1.32 cm, with inoculation of the three microorganisms, to 2.42 cm in the plants treated with *R. intraradices* and *A. brasilense*.

In all cases, the next evaluation period, at 102 dds, there was an increase in plant height: 4.0 at 7.0 cm; the highest height was obtained with the inoculation of the three microorganisms and the lowest with the two bacteria *A. brasilense* and *P. fluorescens* and the control. After the third sampling and until the end of the evaluation, differences in height were greater than 2 cm in treatments with microorganisms, compared to the control.

In other perennial species such as *Theobroma cacao* L., Aguirre-Medina *et al.* (2007) indicate that at 120 dds there are average differences in plant height of 9 cm in those inoculated with *R. intraradices*, in relation to the control. Karthikeyan *et al.* (2009) cite increase in plant height by inoculating the seeds of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. with *A. brasilense* and *P. fluorescens*; however, in the present study it was the combination with lower induction of plant height.



En trigo, Naiman *et al.* (2009) muestran efectos diferentes en la utilización de las fuentes de carbono cuando se inoculan *Azospirillum* y *Pseudomonas* e indican su efecto en el crecimiento. Zambrano y Díaz (2008) citan que *A. brasilense* promueve mayor altura de planta en *Gmelina arborea* Roxb con *Glomus manihotis* Howeler, Sieverding & Schenk y *Paraglomus occultum* (Walker) Morton & Redecker. Estos antecedentes sugieren la contrastante funcionalidad de las coinoculaciones en interacción con las plantas (Jäderlund *et al.*, 2008).

El área foliar evidenció valores de crecimiento, estadísticamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) desde el primer muestreo con la simbiosis de los tres microorganismos. Solamente, a los 130 dds con las bacterias *A. brasilense* + *P. fluorescens* presentó diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ). En otras plantas, como el cacao y café con *R. intraradices*, también hay aumento del área foliar en condiciones de vivero (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011). Al respecto, Sylvia (2005) cita que las plantas después de la colonización micorrízica incrementan su actividad fotosintética, lo que se expresa en más acumulación de biomasa.

### Peso seco de raíz y vástago

La mayor biomasa acumulada en el sistema radical y el vástago durante el primer muestreo se registró con el tratamiento de los tres microorganismos y en el testigo, además fueron estadísticamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) a los otros tratamientos. El lento crecimiento inicial en las plantas inoculadas con dos microorganismos juntos es probable que se relacione con la mayor demanda de fotosintatos por los microorganismos durante la fase de establecimiento, aun cuando, con los tres microorganismos el requerimiento de fuentes de carbono sea mayor y, en consecuencia, el crecimiento inicial es menor. Es posible que la combinación de mecanismos de acción entre los tres microorganismos dependa de la compatibilidad funcional en la fisiología y bioquímica de la interacción, entre los componentes microbianos (Vázquez *et al.*, 2000).

En esta etapa, la disponibilidad de carbohidratos hacia el vástago disminuye, dado que la mayoría de los compuestos son requeridos por la raíz (Roveda y Polo, 2007). Wright *et al.* (2005) documentaron grandes concentraciones de carbohidratos solubles en las raíces micorrizadas de maíz, y agregan que después del periodo de establecimiento de la simbiosis, normalmente, inicia el mecanismo de transporte de nutrientes a la planta y el concomitante incremento en biomasa, como sucedió en los muestreos siguientes con la inoculación de hongos y bacterias.

Los resultados correspondientes a los 102, 130 y 158 dds evidencian que el crecimiento más grande en el sistema radical se presentó al inocular los tres microorganismos juntos. La combinación de bacterias y hongos, *P. fluorescens* + *R. intraradices* mejora el crecimiento radical. *P. fluorescens* puede estimular

In wheat, Naiman *et al.* (2009) show different effects on the use of carbon sources when *Azospirillum* and *Pseudomonas* are inoculated and indicate their effect on growth. Zambrano and Díaz (2008) cite that *A. brasilense* promotes greater plant height in *Gmelina arborea* Roxb with *Glomus manihotis* Howeler, Sieverding & Schenk and *Paraglomus occultum* (Walker) Morton & Redecker. This background suggests the contrasting functionality of co-inoculations in interaction with plants (Jäderlund *et al.*, 2008).

The leaf area evidenced growth values, statistically different ( $P \leq 0.05$ ) from the first sampling with the symbiosis of the three microorganisms. Only, at 130 dds of the *A. brasilense* + *P. fluorescens* bacteria it had a statistical difference ( $P \leq 0.05$ ). In other plants, such as cocoa and coffee with *R. intraradices*, there is also an increase in leaf area under nursery conditions (Aguirre-Medina *et al.*, 2007; 2011). In this regard, Sylvia (2005) cites that plants after mycorrhizal colonization increase their photosynthetic activity, and what is expressed in more accumulation of biomass.

### Dry root and stem weight

The highest biomass accumulated in the root system and the stem during the first sampling was recorded with the treatment of the three microorganisms and in the control were also statistically different ( $P \leq 0.05$ ) to the other treatments. The slow initial growth in plants inoculated with two microorganisms together is likely to be related to the increased demand for photosynthates by microorganisms during the establishment phase, even though with the three microorganisms the demand for carbon sources is greater and, consequently, initial growth is lower. It is possible that the combination of mechanisms of action between the three microorganisms depends on the functional compatibility in the physiology and biochemistry of the interaction between the microbial components (Vázquez *et al.*, 2000).

At this stage, the availability of carbohydrates to the stem decreases, since most of the compounds are required by the root (Roveda and Polo, 2007). Wright *et al.* (2005) documented large concentrations of soluble carbohydrates in mycorrhizal roots of maize, adding that after the period of establishment of the symbiosis, normally initiates the mechanism of transport of nutrients to the plant and the concomitant increase in biomass, as happened in the following samplings with the inoculation of fungi and bacteria.

In the samples corresponding to 102, 130 and 158 dds, the largest growth in the root system occurred when inoculating the three microorganisms together. The combination of bacteria and fungi, *P. fluorescens* + *R. intraradices* improves root growth. *P. fluorescens* can stimulate root proliferation (Sánchez *et al.*, 2005) through the production of indoleacetic acid (Patten and Glick, 2002), which is related to the promotion of plant



la proliferación de raíces (Sánchez *et al.*, 2005) mediante la producción de ácido indolacético (Patten y Glick, 2002), el cual se relaciona con la promoción del crecimiento vegetal (Gamalero *et al.*, 2003). La coinoculación con las dos bacterias *A. brasilense* y *P. fluorescens* produjo 30 % menos de biomasa radical y en el testigo 38 % al final del estudio, en comparación con el tratamiento que incluye a los tres microorganismos.

El peso seco del vástago fue superior y estadísticamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) a los otros tratamientos con la inoculación de los tres microorganismos, durante toda la evaluación. En dos muestreos, a los 102 y 158 dds, en el tratamiento con *R. intraradices* + *P. fluorescens* se registró acumulación de biomasa semejante a la observada con la aplicación de los tres microorganismos, pero sin diferencia estadística entre ellos ( $P \leq 0.05$ ). En él se tuvo un comportamiento similar durante el primer muestreo (Cuadro 1).

La coinoculación con las dos bacterias generó menor cantidad de biomasa en raíz y vástago a los 74, 102 y 130 dds, en comparación con los tratamientos integrados por las bacterias en combinación con *R. intraradices*. En ellas no se obtuvo colonización radical por el hongo (MA) al inicio de la evaluación, pero sí a los 74, 102 y 130 dds, con un incremento de alrededor de 20 %; al final de la evaluación, el porcentaje fue de 26.

La colonización micorrízica es posible que corresponda a los hongos (MA) contenidos en el sustrato, cuya presencia se confirma, además, con los porcentajes del testigo (sin inocular). Los hongos (MA) autóctonos indujeron menor desarrollo vegetal en *T. donnell-smithii* y la mayor respuesta vegetal obtenida con *R. intraradices* sugiere efecto diferencial en la capacidad de los hongos para estimular el crecimiento de la planta, aun cuando existe la posibilidad de haber sido colonizada también por hongos (MA) autóctonos (Figura 1).

La coinoculación de *R. intraradices* + *P. fluorescens* propició un mayor incremento en la biomasa seca de raíz y del vástago, en comparación con la combinación *R. intraradices* + *A. brasilense*. El efecto fue más evidente a partir de los 74 y hasta los 158 dds, aunque la colonización micorrízica fue más alta con la combinación *R. intraradices* + *A. brasilense* durante todo el periodo de evaluación, en comparación con la combinación de *R. intraradices* + *P. fluorescens*, en la que se observó poca colonización radical del hongo (MA) al inicio, pero se incrementó cerca de 60 % al final del muestreo.

La coinoculación de las bacterias *A. brasilense* y *P. fluorescens* respondió de manera diferencial con el mismo hongo (MA). Lo anterior sugiere cierta especificidad entre las bacterias y *R. intraradices*. Así, la coinoculación del hongo con la bacteria específica, puede inducir sinergismo en el crecimiento (Trabelsi y Mhamdi, 2013). Con *A. brasilense* la colonización inicial fue

growth (Gamalero *et al.*, 2003). Co-inoculation with the two bacteria *A. brasilense* and *P. fluorescens* produced 30 % less radical biomass and 38 % in the control at the end of the study, compared to the treatment with the three microorganisms.

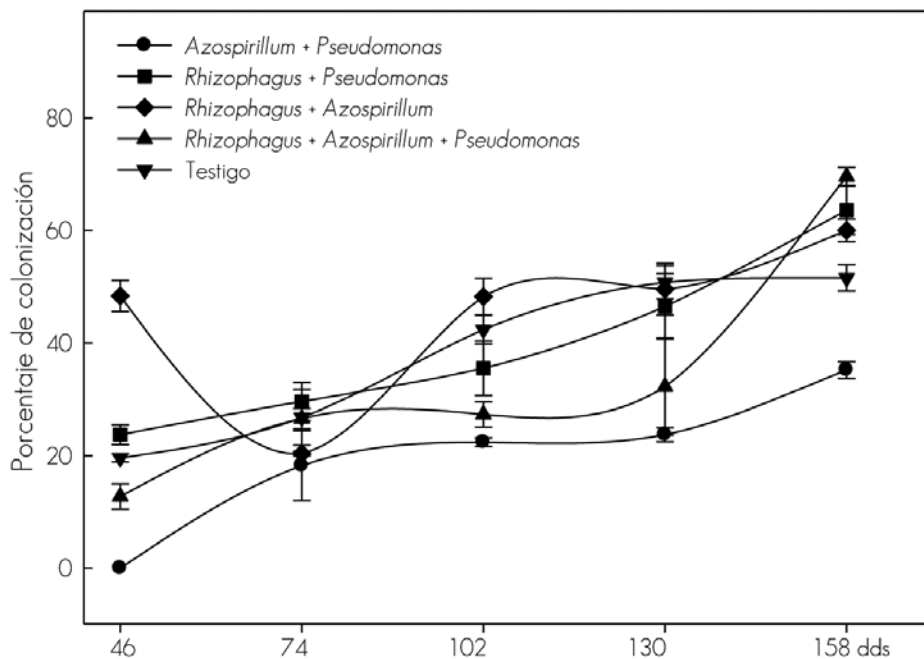
The dry weight of the stem was superior and statistically different ( $P \leq 0.05$ ) to the other treatments with the inoculation of the three microorganisms, throughout the evaluation. In two samples, at 102 and 158 dds, in the treatment with *R. intraradices* + *P. fluorescens* accumulation of biomass similar to that observed with the application of the three microorganisms was found, but without statistical difference between them ( $P \leq 0.05$ ). A similar behavior was observed during the first sampling (Table 1).

The co-inoculation with the two bacteria generated less biomass in root and stem in the samples at 74, 102 and 130 dds, compared to the treatments integrated by the bacteria in combination with *R. intraradices*. No colonization by the fungus (MA) at the beginning of the evaluation was obtained, but at 74, 102 and 130 dds, with an increase of around 20 %, at the end of the evaluation, the percentage was 26.

The mycorrhizal colonization might belong to the fungi in the substrate, whose presence is confirmed in addition, to the percentages of the control (without inoculation). The autoctonous fungi (MA) induced smaller vegetal development of *T. donnell-smithii* and the greater vegetal response obtained from *R. intraradices* suggests a differential effect on the ability of fungi to stimulate plant growth, even when there is a possibility of having been colonized as well by autoctonous fungi (MA) (Figure 1).

The co-inoculation of *R. intraradices* + *P. fluorescens* led to a greater increase in dry biomass of root and stem, compared to the *R. intraradices* + *A. brasilense* combination. The effect was more evident from 74 and 158 dds, although mycorrhizal colonization was higher with the *R. intraradices* + *A. brasilense* combination during the whole evaluation period, when compared to the *R. intraradices* + *P. fluorescens* combination, in which there was little root colonization of the fungus (MA) at the beginning, but increased by about 60 % at the end of sampling.

The co-inoculation of *A. brasilense* and *P. fluorescens* bacteria responded differently with the same fungus (MA). This suggests some specificity between the bacteria and *R. intraradices*. Thus, coinoculation of the fungus with the specific bacterium may induce synergism in growth (Trabelsi and Mhamdi, 2013). With *A. brasilense* the initial colonization was the highest and with *P. fluorescens*, it was at the end of the study, and the same behavior was observed with the inoculation of the two bacteria together with the fungus (MA). In wheat the root growth is increased with *Azospirillum* and radical colonization is not affected when inoculated with *G. mosseae* (Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe and *G. macrocarpum* Tul & Tul (Russo *et al.*, 2005).



La línea vertical indica ± el error estándar de cinco repeticiones.  
 The vertical line indicates ± the standard error of five replications.

Figura 1. Colonización micorrízica en la raíz de plantas de *Tabebuia donnell-smithii* Rose.  
 Figure 1. Mycorrhizal colonization in the root of *Tabebuia donnell-smithii* Rose plants.

la más alta y con *P. fluorescens*, resultó al final del estudio, y el mismo comportamiento se tuvo con la inoculación de las dos bacterias juntas con el hongo (MA). En trigo aumenta el crecimiento radical con *Azospirillum* y no se afecta la colonización radical, al inocularse junto a *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe y *G. macrocarpum* Tul & Tul (Russo *et al.*, 2005).

En los tratamientos con *R. intraradices*, el incremento en el desarrollo de la planta hospedera puede deberse a la mayor absorción de nutrientes, mediante la hifa del hongo. Posiblemente, por el aumento en la capacidad de absorción de las plantas micorrizadas (Leigh *et al.*, 2009), por un efecto estimulador en el desarrollo del micelio, como lo cita Barea *et al.* (1998) con *Pseudomonas* sp. cepa F113 y *G. mosseae*; además de, la fijación de nitrógeno por las bacterias (Hungria *et al.*, 2004). Los resultados confirman la capacidad de colonización de *R. intraradices*, y su efecto en inducir mayor crecimiento de la planta hospedante, en cultivos anuales, como en diferentes variedades de maíz en África (Wright *et al.*, 2005); con maíces criollos, variedades e híbridos en México (Aguirre-Medina 2006); y cultivos perennes, como *Coffea arabica* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2011), *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (Ibarra-Puón *et al.*, 2014) y *Cedrela odorata* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2014).

La colonización micorrízica asociada con las bacterias, no parece estar relacionada con la inducción del desarrollo

In treatments with *R. intraradices*, the increase in the development of the host plant may be due to the greater absorption of nutrients, through the fungus hypha. It is possible from the increase in the absorption capacity of mycorrhized plants (Leigh *et al.*, 2009), due to a stimulatory effect on mycelial development, as stated by Barea *et al.* (1998) with *Pseudomonas* sp. F113 strain and *G. mosseae*; in addition to nitrogen fixation by bacteria (Hungria *et al.*, 2004). Results confirm the ability of *R. intraradices* to colonize, and their effect on inducing higher host plant growth, in annual crops, as well as on different maize varieties in Africa (Wright *et al.*, 2005); with Creole maize, varieties and hybrids in Mexico (Aguirre-Medina, 2006); and perennial crops like *Coffea arabica* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2011), *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (Ibarra-Puón *et al.*, 2014) and *Cedrela odorata* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2014).

Mycorrhizal colonization associated with bacteria does not seem to be related to the induction of plant development of *Tabebuia donnell-smithii*, since it varies according to the combination of the fungus with the bacterium. However, it is expected that mycorrhizal symbiosis presents changes in colonization levels (Sylvia, 2005) due to the interaction of various environmental and management factors (Andrade *et al.*, 2009).



vegetal de *Tabebuia donnell-smithii*, ya que varía de acuerdo a la combinación del hongo con la bacteria. Sin embargo, es de esperarse que la simbiosis micorrízica presente cambios en los niveles de colonización (Sylvia, 2005) debido a la interacción de diversos factores ambientales y de manejo (Andrade *et al.*, 2009).

Existen evidencias de que la micorriza interactúa con una amplia variedad de organismos en la rizosfera, como los diazotófos; aunque, la demanda por carbohidratos aumenta con la coinoculación de más de un microorganismo (Lugtenberg *et al.*, 1999), y se ha estimado que alrededor de 20 % del total de carbono asimilado por la planta es transferido al hongo (Sylvia, 2005). En el estudio que se documenta, el incremento en la acumulación de biomasa en el tratamiento con los tres microorganismos juntos sugiere la compatibilidad funcional de los mismos con la planta hospedante, y que esta abasteció carbono suficiente a los microorganismos.

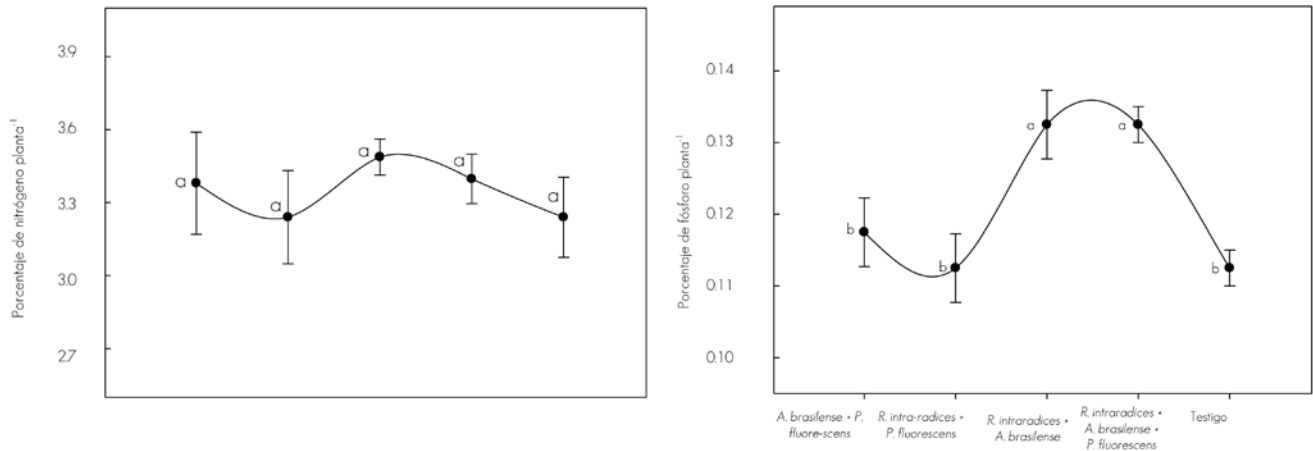
### Contenido de N y P

Con respecto a los nutrientes, la Figura 2 muestra los contenidos en *T. donnell-smithii* a los 140 dds.

There is evidence that mycorrhiza interacts with a wide variety of organisms in the rhizosphere, such as diazotrophs; although the demand for carbohydrates increases with the co-inoculation of more than one microorganism (Lugtenberg *et al.*, 1999), and it has been estimated that about 20 % of the total assimilated carbon by the plant is transferred to the fungus (Sylvia, 2005). In the study that is documented, the increase in the accumulation of biomass in the treatment with the three microorganisms together suggests the functional compatibility of them with the host plant, and that it supplied enough carbon to the microorganisms.

### N and P content

In regard to nutrients, Figure 2 shows the contents in *T. donnell-smithii* at 140 dds.



La línea vertical indica  $\pm$  el error estándar de cinco repeticiones. Letras diferentes son estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Coeficiente de variación en nitrógeno 6.4 % y en fósforo 6.0 %.

The vertical line indicates  $\pm$  the standard error of five replicates. Different letters are statistically significant ( $P \leq 0.05$ ). Coefficient of variation in nitrogen 6.4 % and in phosphorus 6.0 %.

Figura 2. Variación del contenido de nitrógeno y fósforo en el tejido vegetal de *Tabebuia donnell-smithii* Rose por tratamiento a los 140 días.

Figure 2. Variation of nitrogen and phosphorus content in the plant tissue of *Tabebuia donnell-smithii* Rose by treatment at 140 days.

El contenido de nitrógeno en el vástago de las plantas inoculadas con *A. brasilense* + *P. fluorescens*, *R. intraradices* + *P. fluorescens*; y los tres microorganismos juntos fue más alto en comparación con el resto de los tratamientos, pero sin diferencia estadística. Este resultado se puede relacionar con la competencia (Neuhauser y Fargione, 2004) o incompatibilidad (Oyekanmi *et al.*, 2007) entre los microorganismos, ya que su incidencia funcional tiene efecto primario en la nutrición vegetal y, en consecuencia, en el crecimiento de la planta (Cano, 2011). Con *Glomus fasciculatum*

The nitrogen content in the stem of the plants inoculated with *A. brasilense* + *P. fluorescens*, *R. intraradices* + *P. fluorescens*; and the three microorganisms together were higher compared to the rest of the treatments, but with no statistical difference. This result can be related to competition (Neuhauser and Fargione, 2004) or incompatibility (Oyekanmi *et al.*, 2007) among microorganisms, since its functional incidence has a primary effect on plant nutrition and, consequently, on the growth of the plant (Cano, 2011). With *Glomus fasciculatum* (Thaxt.) Gerd. and

(Thaxt.) Gerd. & Trappe no se presentó incremento del contenido de nitrógeno en el tejido vegetal de *Astronium graveolens* Jacq., *Tectona grandis* L.f., *Terminalia amazonia* (Gmel.) Exell y *Gmelina arborea* Roxb., pero sí de otros nutrientes (Hernández y Salas, 2009). En diversas investigaciones, la inoculación de *R. intraradices* + *A. brasilense* aumentó el contenido de N en el tejido vegetal de *C. arabica* (Aguirre-Medina *et al.*, 2011).

La mayor concentración de fósforo en el tejido vegetal se registró cuando se coinoculó *R. intraradices* con *A. brasilense* y con los tres microorganismos juntos. Los valores fueron estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). Muchos estudios han demostrado que las plantas micorrizadas absorben P del suelo de manera más eficiente que las plantas no colonizadas (Andrade *et al.*, 2009). En *Eleusine coracana* Gaertn inoculada con *Glomus fasciculatum* y *A. brasilense* se consigna mayor absorción de P, en comparación con las plantas testigo (Geeta *et al.*, 2013). Se ha indicado que las hifas fúngicas tienen más afinidad por el ion fosfato cuando su concentración es baja en la solución (Tajini y Drevon, 2012), y en sistemas de producción de pocos insumos, la actividad de la micorriza es más efectiva (Grant *et al.*, 2005), con énfasis en suelos de escasa fertilidad (Mudge, 2003).

La coinoculación de *P. fluorescens* con *R. intraradices* no propició mayor contenido de P en el tejido vegetal. Es probable que este efecto se relacione con la funcionalidad de los dos microorganismos y su efecto en la planta de *T. donnell-smithii*.

## Conclusiones

La inoculación de los tres microorganismos juntos incrementó el peso seco de raíz y vástago de *T. donnell-smithii* durante toda la evaluación, y al final de la misma la coinoculación de *R. intraradices* + *P. fluorescens* se expresó en similar acumulación de biomasa. El efecto de las combinaciones de microorganismos en la asignación de materia seca se expresó después de los 74 dds, momento en el cual se incrementó la colonización radical del hongo micorrizógeno arbuscular.

La coinoculación de los tres microorganismos y la coinoculación *R. intraradices* y *A. brasilense* promovieron mayor contenido de N y P en el tejido vegetal.

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Contribuciones por autor

Juan Francisco Aguirre Medina: planeación y diseño de la investigación, toma de datos en muestreos, preparación de muestras para análisis vegetal, colonización radical, formato y revisión del escrito; Juan Francisco Aguirre Cadena: establecimiento y mantenimiento del experimento, preparación de sustrato, llenado de bolsa, riego y muestreos; Miguel Antonio Ramón Castro: colecta de semilla, establecimiento de experimento.

Trappe did not present increase of the nitrogen content in the plant tissue of *Astronium graveolens* Jacq., *Tectona grandis* L.f., *Terminalia amazonia* (Gmel.) Exell and *Gmelina arborea* Roxb., but it did in other nutrients (Hernández and Salas, 2009). In other investigations, inoculation of *R. intraradices* + *A. brasilense* increased the N content in the plant tissue of *C. arabica* (Aguirre-Medina *et al.*, 2011).

The highest phosphorus content in plant tissue was recorded when *R. intraradices* was co-inoculated with *A. brasilense* and with the three microorganisms together. The concentrations were statistically different ( $P \leq 0.05$ ). Many studies have shown that mycorrhizal plants absorb P from soil more efficiently than non-colonized plants (Andrade *et al.*, 2009). In *Eleusine coracana* Gaertn inoculated with *Glomus fasciculatum* and *A. brasilense*, greater uptake of P is recorded compared to control plants (Geeta *et al.*, 2013). It has been reported that fungal hyphae have a higher affinity for phosphate ion when their concentration is low in the solution (Tajini and Drevon, 2012), and in low input production systems, mycorrhizal activity is more effective (Grant *et al.*, 2005), with emphasis on low fertility soils (Mudge, 2003).

Co-inoculation of *P. fluorescens* with *R. intraradices* did not lead to higher P content in plant tissue. It is likely that this effect is related to the functionality of the two microorganisms and their effect on the *T. donnell-smithii* plant.

## Conclusions

The inoculation of the three microorganisms together increased the dry weight of the root and the stem of *T. donnell-smithii* along the whole assessment and at the end of it the co-inoculation of *R. intraradices* + *P. fluorescens* expressed itself in a similar biomass accumulation. The effect of the combinations of microorganisms in the asignation of dry matter became apparent after 74 dds, a time at which the root colonization of the arbuscular mycorrhizal fungi increased.

The coinoculation of the three microorganisms and the coinoculation *R. intraradices* and *A. brasilense* promoted a greater content of N and P in the vegetal tissue.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Contribution by autor

Juan Francisco Aguirre Medina: research planning and desing, data sampling, sample handling for vegetal analysis, root colonization, structuring and review of the manuscript; Juan Francisco Aguirre Cadena: experiment control and substrate preparation, bag filling, watering and sampling; Miguel Antonio Ramón Castro: seed collection, and establishment of the experiment.

*End of the English version*

## Referencias

- Aguirre-Medina, J. F. 2006. Biofertilizantes microbianos: Experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Centro de Investigaciones Regionales Pacífico Sur-Campo Experimental Rosario Izapa, Rosario-Izapa, Chis., México. 201p.
- Aguirre-Medina, J. F., A. Mendoza-López, J. Cadena-Iñiguez y C. H. Avendaño-Arrazate. 2007. Efecto de la biofertilización en vivero del cacao (*Theobroma cacao*) con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner y *Glomus intraradices* Schenk & Smith. *Interciencia* 32(8): 541-546.
- Aguirre-Medina, J. F., D. M. Moroyoqui-Ovilla, A. Mendoza-López, J. Cadena-Iñiguez, J., C. H. Avendaño-Arrazate y J. F. Aguirre-Cadena. 2011. Aplicación de *A. brasilense* y *G. intraradices* a *Coffea arabica* en vivero. *Agronomía Mesoamericana* 22 (1):71-80.
- Aguirre-Medina, J. F., F. O. Mina-Briones, J. Cadena-Iñiguez, J. D. Dardón-Zunun, y D. A. Hernández-Sedas. 2014. Crecimiento de *Cedrela odorata* L. Biofertilizada con *Rhizophagus intraradices* y *Azospirillum brasilense* en vivero. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 20 (3):177-186.
- Andrade, S. A. L., P. Mazzafera, M. A. Schiavinato and A. P. D. Silveira. 2009. *Arbuscular mycorrhizal* association in coffee. *Journal of Agricultural Science* 147(2): 105-115.
- Arthursson, V., R. D. Finlay and J. K. Jansson. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8(1):1-10.
- Barea, J. M., G. Andrade, V. Bianciotto, D. Dowling, S. Lohrke, P. Bonfante, F. O'gara, F. and C. Azcon-Agular. 1998. Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied Environmental Microbiology* 64(6):2304-2307.
- Bashan, Y. and L. E. De-Bashan. 2010. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-A Critical Assessment. *Advances in Agronomy* 108:77-136.
- Cano, A. M. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 14(2):15-31.
- Diouf, D., R. Duponnois, A. T. Ba, M. Neyra and D. Lesueur. 2005. Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* spp. improves salt tolerance in greenhouse conditions. *Functional Plant Biology* 32 (12):1143-1152.
- Gamaleri, E., L. Fracchia, M. Cavaletto, J. Garbaye, P. Frey-Klett, G. C. Varese and M. G. Martinotti. 2003. Characterization of functional traits of two fluorescent pseudomonads isolated from basidiomes of ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology Biochemistry* 35 (1):55-65.
- Geeta, B. H. C. Patil, H. C. Lakshman, Romana M. Mirdhe and B. S. Agadi. 2013. Effect of co-inoculation of AM fungi and two beneficial microorganisms on growth and nutrient uptake of Eleusine corocana Gaertn. (Finger millet). *Asian Journal of Plant Science and Research* 3(1):26-30.
- Grant, C., S. Bittman, M., Montreal, C. Plenchette and C. Morel. 2005. Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. *Canadian Journal of Plant Science* 85(1):3-14.
- Hernández, W. y E. Salas. 2009. La Inoculación Con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. *Agronomía Costarricense* 33(1):17-30.
- Hungria, M., R. J. Campo, E. M. Souza y 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(1-2):413-425.
- Ibarra-Puón, J. C., J. F. Aguirre-Medina, A. Ley-De Coss, J. Cadena-Iñiguez y A. Zavala-Mata. 2014. Inoculación de *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner con *Rhizophagus intraradices* (Schenk et Sm.) Walker et Schuessler y *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner en vivero *Revista Chapingo Serie Horticultura* 20(2):201-213.
- Jäderlund, L., V. Arthursson, U. Granhall and J. K. Jansson. 2008. Specific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria: as revealed by different combinations. *FEMS Microbiology Letters* 287(2): 174-180.
- Karthikeyan, B., A. J. Cheruth and M. M. Azooz. 2009. Individual and Combined Effects of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on Biomass Yield and Amino Acid Production in *Catharanthus roseus*. *Academic Journal of Plant Science* 2 (2):69-73.
- Lalitha, S., K. Rajeshwaran, P. Senthil Kumar and S. Deepa. 2011. Role of AM fungi and rhizobial inoculation for reclamation of phosphorus deficient soil. *Asian Journal of Plant Science* 10(3):227-232.
- 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 Phytologist* 181(1):199-207.
- Lucy, M., E. Reed and B. R. Glick. 2004. Application of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86(1):1-25.
- Lugtenberg, B. J. J., L. V. Kravchenko and M. Simons. 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental Microbiology* 1:439-446.
- Miranda, F. 1998. La Vegetación de Chiapas. Edición Gobierno del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chis., México. 600p.
- Mudge, S. R., F. W. Smith and A. E. Richardson. 2003. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on pyruvate as a sole P source. *Plant Science* 165(4):871-878.
- Naiman, A. D., A. Latronico and I. E. Garcia de Salamone. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and culturable rhizosphere microflora. *European Journal of Soil Biology* 45(1):44-51.
- Neuhauser, C. and J. E. Fargione. 2004. A mutualism-parasitism continuum model and its application to plant-mycorrhizae interactions. *Ecological Modelling* 177:337-352.
- Oyekanni, E. O., D. L. Coyne, O. E. Fagade and O. Osonubi. 2007. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. *Crop Protection* 26: 1006-1012.
- Patten, C. L. and B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied Environmental Microbiology* 68(8):3795-3801.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *The British Mycology Society* 55(1): 58-161.
- Qiu, M. Q., H. Zhang, G. X. Wang and Z. Q. Liu. 2008. Effects of nitrogen on plant-microorganism interaction. *EurAsian Journal of BioScience* 2:34-42.
- Richardson, A. E., J. M. Barea, A. M. Mc Neill and C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305-339.
- Roveda, R. y C. Polo. 2007. Mecanismos de adaptación de maíz asociado a *Rhizophagus* spp. en suelos con bajo fósforo disponible. *Agronomía Colombiana* 25(2): 349-356.
- Russo, A., M. Götz, C. Felici, C. Collados, Y. Moënn-Loccoz, J. Vanderleyden, A. Toffanin, J. M. Barea, K. Smalla and M. Nuti. 2005. Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants. *Biology Fertility Soils* 41(5):301-309.
- Sánchez, L., S. Weidmann, C. Arnould, A. R. Bernard, S. Gianinazzi and V. Gianinazzi-Pearson. 2005. *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* Trigger DMI3-Dependent Activation of Genes Related to a Signal Transduction Pathway in Roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 139(2):1065-1077.

Secretaría de medio ambiente y recursos naturales (Semarnat). 2010. Informe de evaluación externa de los apoyos de reforestación, ejercicio fiscal 2009. Comisión Forestal. México, D.F., México. 140p.

Statistical Analysis System (SAS). 1999-2000. SAS/STAT User's Guide. Ver 8.1 SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. n/p.

Sylvia, M. D. Mycorrhizal symbioses. 2005. In: Sylvia, M. D., J. J. Fuhrmann, G. P. Harte and A. D. Zuberer. (ed.). Principles and Applications of Soil Microbiology. Second Edition. Upper Saddle River, NJ, USA. Pearson Prentice Hall. pp. 263-282.

Tajini, F. and J. J. Drevon. 2012. Phosphorus use efficiency in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as related to compatibility of association among arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. *African Journal of Biotechnology* 11(58):12173-12182.

Trabelsi, D. and R. Mhamdi. 2013. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2013/863240.

Vázquez, M. M., S. César, R. Azcón and J. M. Barea. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15:261-272.

Wright, D. P., J. D. Scholes, D. J. Read and S. A. Rolfe. 2005. European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytologist* 167(3):881-896.

Zambrano, J. A. y L. A. Díaz. 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.

