

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



Tecnológico Nacional de México Instituto Tecnológico de la Zona Maya

Inoculación de *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*) con HMA para hacer más eficiente el ciclaje de nutrimentos en sistemas silvopastoriles en el sur de Quintana Roo

**Informe Técnico de Residencia Profesional
que presenta el C.**

Abigail Barahona Córdova

N° de Control 12870078

Carrera: Ingeniería en Agronomía

Asesor Interno: Dr. Iván Oros Ortega

Juan Sarabia, Quintana Roo

Diciembre 2016



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional del estudiante de la carrera de INGENIERÍA EN AGRONOMÍA, **Abigail Barahona Córdova**; aprobado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por el asesor interno Dr. Iván Oros Ortega, el asesor externo el Dr. Fernando Casanova Lugo, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo titulado: **“INOCULACIÓN DE LEUCAENA (*Leucaena leucocephala*) CON HMA PARA HACER MAS EFICIENTE EL CICLAJE DE NUTRIMENTOS EN SISTEMAS SILVOPASTORILES EN EL SUR DE QUINTANA ROO”**, que presenta como requisito parcial para acreditar la asignatura de Residencia Profesional de acuerdo al Lineamiento vigente para este plan de estudios, dan fe de la acreditación satisfactoria del mismo y firman de conformidad.

ATENTAMENTE

Asesor Interno



Dr. Iván Oros Ortega

Asesor Externo



Dr. Fernando Casanova Lugo

Juan Sarabia, Quintana Roo, diciembre, 2016.

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento es para mi dios que gracias a su fortaleza que me brindó estoy logrando llegar al final de un largo camino.

Agradezco a mi esposa Ingrid S. Méndez Chable que siempre me apoyó en mis estudios y aún sigue haciéndolo, ella que es el amor de mi vida en conjunto con mi bello hijo Gael Barahona Méndez, de igual manera le agradezco demasiado a mi querida suegra Ana Chable que siempre me ha dado su apoyo y más que eso es la madre de la mujer que amo.

A mi viejo que siempre me ayudo y me enseñó los primeros pasos en mi vida.

A mi madre y hermanos que siempre me motivaron a culminar mis estudios, de igual forma a mi padre que ya no se encuentra a mi lado pero, sin duda alguna, me apoyó desde el cielo.

Agradezco infinitamente a mi tía Leticia Palacios y mis primos Rodrigo Ovando y Ruth Reyes, quienes siempre me apoyaron con mis estudios.

A mis profesores que gracias a ellos se adquiere un nuevo conocimiento a diario o durante mi carrera, pero en especial a mi profesor el Dr. Iván Oros Ortega el cual me motivó a realizar mis estudios con firmeza y dedicación además de ser una persona con gran calidad humana siempre le estaré agradecido y le seré incondicional.

Estoy muy agradecido con Araceli Mar Pérez, Jorge Mar Pérez y Mauricio Arias Uc, quienes me apoyaron dándome un trabajo y permitiéndome continuar con mis estudios, además de convertirse en unos muy buenos amigos su calidad humana sobresale ante muchos.

RESUMEN

La producción agropecuaria a mediana y gran escala en su mayoría han sido con un uso excesivo de fertilizantes sintéticos, lo cual ha traído como consecuencia el deterioro de los recursos naturales y contaminación ambiental, así como altos costos de producción. Hoy día, se ha comprobado en diversas especies de plantas de interés agrícola, forestal y pecuario, que las interacciones ecológicas, como las establecidas con hongos micorrízicos arbusculares pueden contribuir al cuidado del ambiente. Este trabajo tiene por objetivo identificar el efecto de los HMA nativos en el crecimiento de plántas de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham. Asimismo se pretende identificar las principales especies de HMA presentes en un sitio natural en la zona sur del estado de Quintana Roo. El diseño experimental aplicado fue completamente al azar, en el cual fueron probados los factores micorrización y fertilización, con tres y dos niveles respectivamente (3x2), para un total de seis tratamientos ($n = 15$): Testigo; 2) Suelo rizosférico; 3) Inóculo Comercial; 4) Fertilizadas con NPK; 5) Suelo rizosférico + NPK y 6) Inóculo comercial + NPK. Las variables a evaluar fueron: altura, diámetro, peso seco, área foliar, nutrimentos de la planta, colonización micorriza e identificación de HMA. Además fueron establecidos cultivos trampa donde se probó : a) maíz (*Zea maíz*) consorgo (*Sorghum spp.*) y b) leucaena (*Leucaena leucocephala* cv. Cunningham) como especies trampa. Los resultados preliminares muestran que las plántulas de los cultivos trampa presentan alto niveles de colonización micorrizica, así como diversas estructuras tales como arbusculos, hifas y vesículas. Todavía falta evaluar diversos tiempos y la obtención de datos en ambos ensayos (inoculación de plántulas y establecimiento de cultivos tramapa), así como distintos análisis para concluir el presente estudio.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO	3
2.1. Misión	4
2.2. Visión.....	4
III.PROBLEMAS A RESOLVER.....	5
VI. OBJETIVOS	6
6.1. Objetivo general.....	6
6.1. Objetivos específicos	6
V. JUSTIFICACIÓN.....	7
VI. MARCO TEÓRICO	8
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	11
7.1. Experimento 1. Aislamiento de micorrizas nativas por medio de cultivos trampa ...	11
7.1.1. Esterilización de arena	11
7.1.2. Establecimiento de los cultivos trampa.....	11
7.1.3. Análisis de los cultivos trampa	13
7.1.4. Cultivos monospóricos	15
7.2. Experimento 2. Micorrización de plántulas de <i>Leucaena leucocephala cv.</i> Cunningham.....	15
7.2.1. Diseño experimental	15
7.2.2. Colecta de suelo rizosférico.....	17
7.2.3. Siembra.....	17
7.2.4. Trasplante de las plántulas.....	18
7.2.5. Variables de Respuesta	18
VIII. RESULTADOS	21
IX. CONCLUSIONES.....	24
X. COMPETENCIAS APLICADAS O DESARROLLADAS	25
XI. REFERENCIAS	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Instituto Tecnológico de la Zona Maya.....	3
Figura 2. Proceso de esterilización de la arena para cultivos trampa.	11
Figura 3. a) siembra de los cultivos trampa, b) escarificación de las semillas de leucaena.	13
Figura 4. Reactivos usados en clareo y tinción.	14
Figura 5. Montaje de las raíces en los porta objetos para su observación tanto de leucaena como de maíz.	15
Figura 6. a) Siembra de la leucaena y b) charola forestal usada para la siembra previamente esterilizada.	18
Figura 7. Estructuras de HMA tomadas de las raíces de los cultivos trampa del suelo colectado en <i>Leucaena leucocephala</i> en el ejido de Sac-Xan Quintana Roo, México: a) vesículas observadas en raíces donde se usó como cultivo trampa a <i>L. leucocephala</i> ; b) vesícula e hifa observadas en Leucaena; c) vesículas en maíz; d) arbusculo, vesícula e hifa en maíz; e) arbusculo, vesícula e hifa en maíz y f) arbusculo, vesícula e hifa en maíz.	22
Figura 8. Promedio de altura y diámetro evaluados en las plantas de <i>Leucaena leucocephala</i> cv. Cunningham, en la zona sur del estado de Quintana Roo, México: 1) Testigo; 2) Suelo rizosférico; 3) Inóculo Comercial; 4) Fertilizadas con NPK; 5) Suelo rizosférico + NPK y 6) Inóculo comercial + NPK.....	23

I. INTRODUCCIÓN

La leguminosa *Leucaena leucocephala* es un árbol que puede alcanzar hasta 20 m de altura, alta habilidad para fijar nitrógeno, rápido crecimiento y alta producción de biomasa (Ruíz y Febles, 1987; Duguma *et al.*, 1988). Debido a esto la leucaena, es considerada como una de las mejores plantas para su siembra en sistemas silvopastoriles debido a su calidad nutricional, de igual manera, se le considera una planta mejoradora de los suelos por su capacidad de fijación de nitrógeno y a la rápida descomposición de sus hojas (Zárate, 1987).

El establecimiento de leucaena en sistemas de producción agropecuarias tropicales mejora las condiciones químicas de los suelos, constituyendo una alternativa en la fertilidad de los suelos deficientes en nutrientes (Zarate, 1987). Hoy día, se ha comprobado en diversas especies de plantas de interés agrícola, forestal y pecuario, que las interacciones ecológicas, como las establecidas con hongos micorrízicos arbusculares pueden contribuir al cuidado del ambiente ya que pueden disminuir el uso de fertilizantes químicos así como los costos de producción de forrajes (Guerra, 2008).

Por otra parte, se ha comprobado que el éxito de la supervivencia de plántulas en el campo aumenta con la asociación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) hasta en un 54% (Monroy *et al.* 2007), ya que estos pueden y llegan a formar una asociación simbiótica a través de raíces secundarias de la mayoría de las plantas, esta asociación data de años prehistóricos (Bonfante y Genre, 2008).

A pesar de lo anterior, existen vacíos de información relacionada con la simbiosis entre los hongos micorrízico arbusculares y la leucaena en la zona sur de Quintana Roo. Más aun, sobre aspectos de la eficiencia en el anclaje o retención de macro y micro elementos. Por lo tanto, es de esperarse que el estudio de la inoculación de HMA en la leucaena contribuya a abordar estas temáticas y así

contribuir a la fertilidad de los suelos tropicales, los cuales poseen baja fertilidad natural, y que han sido degradados debido a las prácticas agrícolas intensivas como en los monocultivos, y el cambio de uso de suelo como la tumba-roce-quema de potreros (NAS, 1997). A la fecha se han realizado diversos estudios de HMA y su efecto en el crecimiento de especies de importancia ecológica o agronómica, con diversidad de enfoques (Guadarrama y Alvares-Sánchez, 1999; Rodríguez-Morelos *et al.*, 2015). Sin embargo, información al respecto es escasa dado que los estudios se han limitado a un puñado de especies vegetales y no se conoce la respuesta de las poblaciones de leucaena asociadas a los hongos nativos, sobretodo; existen vacíos en la caracterización de la diversidad de hongos asociados, así como el efecto de su inoculación sobre el desarrollo y calidad nutricional de las plántulas.

II. DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO

El estudio se llevó a cabo en el Instituto Tecnológico de la Zona Maya Ejido Juan Sarabia, carretera Chetumal–Escárcega kilómetro 21.5, en las coordenadas 18°30'6.027" N Y 88°28'53.609", en el Laboratorio de Control Biológico del mencionado instituto.



Figura 1: Instituto Tecnológico de la Zona Maya

2.1. Misión

“Contribuir a la formación integral de profesionales que coadyuven al desarrollo socioeconómico de las zonas rurales del país y en lo particular del Estado de Quintana Roo, mediante la prestación de servicios de educación superior, así como de investigación, desarrollo tecnológico y capacitación para el trabajo; orientados al sector agropecuario y forestal para mejorar su producción y productividad”.

2.2. Visión

“Ser una institución con excelencia académica, líder en el desarrollo agro empresarial, con tecnologías acordes a las características agroecológicas y sociales del Caribe, que a través de la investigación y vinculación participe activamente en el desarrollo socioeconómico de la región y además cuente con una cultura organizacional de calidad”.

III.PROBLEMAS A RESOLVER

Se plantea resolver con nuestro estudio los siguientes aspectos y necesidades que se necesitan cubrir en nuestra región:

- Se plantea contribuir al problema de la desertificación de los suelos a causa de la tala o la agricultura de la región sur del estado de Quintana Roo.
- Contar con alimentó forrajero para los productores locales en tiempo de sequía.
- Estudiar la simbiosis entre micorrizas nativas con plantas comunes o de interés productivo en nuestra región, en este caso *Leucaena*, para determinar su beneficio en producción ya sea de forrajes, anclaje de nutrientes o mejoramiento del suelo.
- Se espera obtener e identificar cepas de micorrizas nativas, para poder llegar a obtener a futuro fertilizantes biológicos.
- Contribuir a disminuir el uso excesivo de fertilizantes químicos, en nuestra región, y contribuir a reducir costos y efectos nocivos, lo anterior a través del uso de nuevas tecnologías como inoculantes biológicos.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de crecimiento y follaje en leucaena (*Leucaena leuccephala* cv. Cunningham), con la inoculación de hongos micorrízicos nativos de Quintana Roo para mejorar el ciclaje de nutrimentos en sistemas silvopastoriles, al igual que reconocer los tipos de estructuras micorrízicas.

6.1. Objetivos específicos

- Determinar las estructuras de los hongos micorrízicos arbuscular (HMA) nativos en plantas de *leucaena* de la zona sur de Quintana Roo.
- Evaluar el efecto de las tasas de crecimiento en plantas inoculadas con hongos nativos y con hongos comerciales.
- Evaluar el efecto de los hongos micorrízicos nativos en *Leucaena leuccephala* cv. cunninghamm.
- Evaluar la colonización de los HMA en diferentes cultivos trampas y su caracterización.
- Evaluar los nutrientes del follaje de la *Leucaena leuccephala* cv. Cunningham de diferentes tratamientos en dos de ellos incluyendo la adición de NPK.

V. JUSTIFICACIÓN

La leguminosa *L. leucecephala*, *guaje* o *huaxim* como es comúnmente conocida, es originaria de México y centro América. Es una planta arbustiva, aunque en ocasiones se le puede encontrar en la vegetación natural como un árbol (Flores, 1993). Debido a los costos elevados de alimentos concentrados en la ganadería, es necesario promover la utilización de fuentes alimenticias que sean económicas y de alto valor nutritivo, que ayuden a maximizar la producción animal. Además de considerar las especies que sean poco demandantes en el uso de fertilizantes químicos (Solorio-Malayo, 2008). Hoy en día, existen nuevas técnicas que se han comenzado a implementar para la producción de pastos forrajeros y la reducción, tanto de uso de químicos como la detención de la erosión de suelos son los sistemas silvopastoriles, los cuales ayudan en la mejora de la finca, ya que se pueden usar plantas forrajeras leguminosas las cuales son fijadoras de nitrógeno y contribuyen a la mejora de este mismo, junto con la ayuda de HMA se pueden mejorar y obtener forrajes de muy buena calidad, beneficiando la mejora del suelo (Casanova-Lugo *et al.*, 2015). Las leguminosas y los pastos que crecen en condición natural o de cultivo generalmente establecen asociación con hongos micorrízicos arbusculares. Los HMA forman abundantes hifas externas y estimulan el desarrollo de las raíces con lo que aumenta la capacidad del sistema radical para absorber y traslocar elementos, principalmente el fósforo, nitrógeno, potasio macro elementos y micro elementos con lo cual se mejora significativamente el crecimiento de la planta (Smith y Read, 2008). No obstante, aún existen vacíos de información entorno al uso de HMA en *Leucaena*, por lo tanto, es urgente entender aspectos de diversidad de HMA asociados, así como su probar su potencial efecto en el crecimiento de las plántulas.

VI. MARCO TEÓRICO

En la zona sur del estado de Quintana Roo, se ve afectada por la falta de forrajes de buena calidad y buen rendimiento por hectárea. La mayor parte de las zonas dedicadas a la producción de leche o carne provenientes de rumiantes se encuentran cultivadas con pasto de limitado potencial productivo, que han demostrado ser insuficientes en el aporte de material vegetativo (material verde o materia seca) y nutrientes que mantengan una producción estable y económica. En tal sentido año con año los productores se ven en la difícil tarea de contar con suficiente alimento para su ganado, afectando de manera directa la producción de carne, leche y otros productos pecuarios (Murrieta *et al.*, 2015). 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).

En el mundo existen dos grandes sistemas de alimentación para la producción de ovinos o ganado en general, uno intensivo, utilizando concentrados y el otro extensivo, sistema que solo utiliza pasto. La producción a base de concentrados incrementa notablemente los indicadores productivos, tanto la ganancia de peso como la producción de leche, sin embargo, en la mayoría de los casos el alto costo de los concentrados limita el margen de la utilidad para el productor. La alimentación basada solamente en pastos mantiene la producción de carne y leche relativamente baja, debido al déficit principal de disponibilidad de proteína vegetal verdadera en cantidad y calidad suficiente a través del año (Delgado *et al.*, 2001).

Por las razones expuesta, 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, pueden competir con ventaja ante la apertura de mercados (Ibrahim *et al.*, 2000).

Una de las nuevas tecnologías que se podrían implementar en el mejoramiento de sistemas de producción de forrajes sin perjudicar el ambiente y beneficiando al productor con bajos costo e incremento de ganancia de peso son los Sistemas Silvopastoriles (SSP) (Solorio-Sánchez, 2003).

Los sistemas silvopastoriles proveen a los animales una dieta rica en proteína por ello la implementación de estos sistemas se convierte en una ventaja. Las leguminosas usadas para dichos sistemas pasan de los 18 % de proteína y se pueden alcanzar ganancias de pesos en zonas tropicales hasta de 800 g⁻¹ animal⁻¹ día⁻¹ en bovinos, y un incremento de hasta dos litros de leche por vaca/día, y en el caso de ovinas ganancias de peso de 106 g/día (Wencomo, 2008; Barros-Rodríguez *et al.* 2012).

Por tales virtudes, la asociación de leguminosas forrajeras como *L. leucocephala* con gramíneas dentro de los SSP se presentan como una alternativa para la producción (Solorio-Sánchez *et al.*, 2003). La *L. leucocephala* es una leguminosa arbórea de clima tropical que es útil para la reforestación y mejoramiento de suelo debido al aporte de materia orgánica y de nitrógeno. Además, es tolerante a suelos alcalinos y ligeramente ácidos (pH 5.2), a periodos largos de sequía y exceso de luz (Zárate, 1987; Sethi y Kulkarni, 1995; Shelton y Brewbaker, 1999). La planta produce follaje rico en nitrógeno (aproximadamente el 4.3% de su peso de materia seca) de rápida descomposición. Un árbol bien desarrollado puede producir entre 500 y 1500 g de semilla limpia, y se llegan a cosechar hasta 50 toneladas ha⁻¹ de hojas y vainas verdes y 50 m³ ha⁻¹ año⁻¹ de leña (Zárate, 1987).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) tienen una gran capacidad de dispersión y un gran número de hospedantes; estos hongos transforman las condiciones físicas, químicas y biológicas de la rizósfera (Smith y Read, 2008).

Además, los HMA aumentan la absorción de nutrientes de difícil acceso para las plantas (P, Zn, Cu, B, S), aumentan el área de contacto entre la planta y el suelo, e incrementan la producción de enzimas oxidativas; todas estas características brindan protección a la planta ante patógenos y condiciones de estrés que se encuentren en el suelo (Joner y Leyval, 2001; Siddiqui y Pichtel, 2008). La presencia de los HMA y los rizobios influyen en la habilidad de la planta para obtener nitrógeno y otros nutrientes (Basis *et al.*, 2006). A su vez, las plantas pueden influir en el cambio del ecosistema secretando metabolitos secundarios en la rizósfera que atraen o inhiben el crecimiento de microorganismos específicos, por lo que se debe aprovechar esta ventaja ecológica para biorremediación de suelos (Basis *et al.*, 2006).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Experimento 1. Aislamiento de micorrizas nativas por medio de cultivos trampa

7.1.1. Esterilización de arena

Se realizó la esterilización del sustrato a utilizar para establecer los cultivos trampa y en este caso se usó arena común. Con la finalidad de eliminar cualquier hongo patógeno o micorrízico.



Figura 2. Proceso de esterilización de la arena para cultivos trampa.

7.1.2. Establecimiento de los cultivos trampa

Los cultivos trampa se realizaron en vasos de unicel de un litro. El diseño que se usó para estos cultivos consistió en cinco vasos con semillas de *L. leucocephala* cv. Cunningham y cinco con semillas de maíz y sorgo (Cuadro 1).

Como inóculo se agregó una pequeña capa de aproximadamente un centímetro de grosor, este suelo fue colectado en un sitio natural del ejido de Sac-Xan, municipio de Othón P. Blanco, en la zona sur del estado de Quintana Roo.

El muestreo se realizó en 10 puntos diferentes dentro de la misma área de aproximadamente 3 hectáreas, los cuales se realizaron a diferentes distancias, es decir, de punto a punto hubo una distancia de 100 metros, en cada punto de recolección se extrajo suelo rizosférico justo debajo de árboles de *Leucaena* recolectando 0.016 m³ (0.20 x 0.40 x 0.20 m) por punto muestreado.

Cuadro 1. Tratamientos en los aislamientos en los cultivos trampa de hongos micorrízico arbusculares de la diversidad asociada a un sitio natural de *Leucaena leucocephala* en el Ejido Sac-Xan, municipio de Othón P. Blanco en la zona sur de Quintana Roo.

Tratamientos		N°
Tratamiento 1	<i>Leucaena leucocephala</i> cv. Cunningham	5
Tratamiento 2	Maíz, Sorgo	5

Para la siembra de las semillas de *Leucaena* en los cultivos trampa, como primer paso se escarificaron sumergiéndolas en agua hirviendo de 2 a 3 minutos (Cervantes *et al.*, 1996). De igual manera, en cada vaso se sembraron de 10 a 20 semillas de las distintas especies según los tratamientos, sembradas las cuales fungieron como cultivos trampa.



Figura 3. a) siembra de los cultivos trampa, b) escarificación de las semillas de leucaena.

El montaje de los cultivos trampa se llevó a cabo el día 16/octubre/2016 y el análisis se realizó dos meses después de su establecimiento.

Todavía, por cuestiones de tiempo, en las siguientes etapas de la investigación, se espera determinar con los cultivos trampa: a) composición de especies y b) abundancia (Morfología y estudios de biología molecular).

7.1.3. Análisis de los cultivos trampa

Para analizar las raíces de los cultivos trampa y determinar si ya están infectadas con micorrizas nativas se usó el método de clareo y tinción de raíces de Phillips y Hayman (1970) modificado por Kormanik *et al.* (1980). El primer paso en esta técnica es el clareo del citoplasma y núcleo de las células de la raíz con una solución de KOH al 10 % para posteriormente acidificarlas con HCl y por último teñirlas con el azul de tripano, lo único que se modificó en el método fueron los tiempos utilizados, ya que por razones de que las raíces son muy delgadas y someterlas a tanto temperatura y presión provocaría una degradación de las mismas (Cuadro 2).

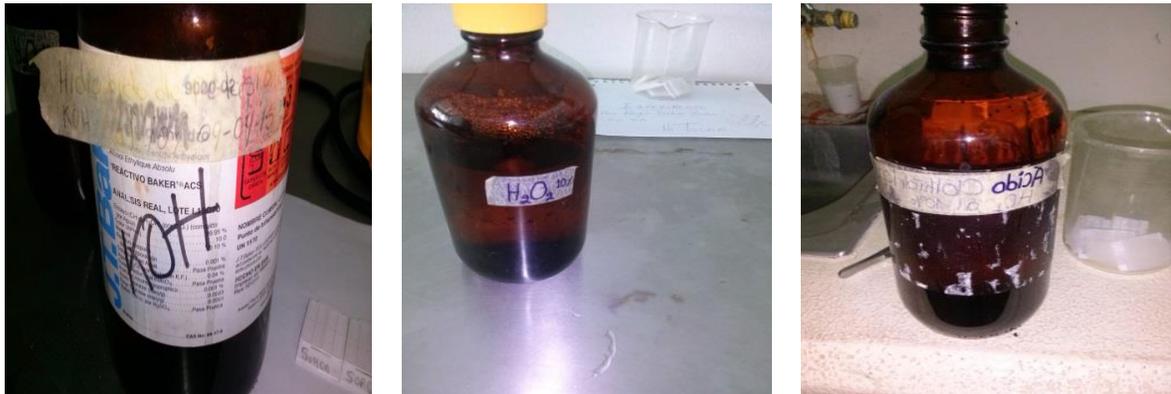


Figura 4. Reactivos usados en clareo y tinción.

Cuadro 2. Tiempos utilizados en la tinción.

Metodologías	Tiempo en KOH	Tiempo en HCl	Tiempo de Tinción	de Retiro de tinción
Phillips y Hayman (1970) modificado por Kormanik <i>et al.</i> (1980).	10min/10 libras	3min/T°amb.	10min/10 libras	Ácido láctico
Modificación	24hrs/ T° amb.	30min/T°amb	10min/10 libras Pero se dejó reposar con el colorante 24 hrs.	No se retiró el colorante

Al término de la actividad, se procedió al montaje de las raíces, ya previamente teñidas, sobre láminas portaobjetos para su observación en el microscopio utilizando un aumento de 40x y determinar el grado de infección con el que se cuenta en las mismas.

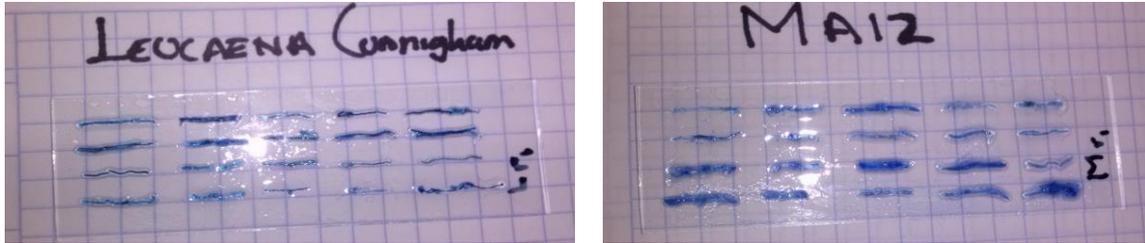


Figura 5. Montaje de las raíces en los porta objetos para su observación tanto de leucaena como de maíz.

Las raíces observadas, ya estaban colonizadas con micorrizas y se realizó un conteo de las mismas para determinar el grado de colonización el cual quedó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Infección} = \frac{\text{No. de segmentos observados}}{\text{No. de segmentos colonizados}} \times 100$$

7.1.4. Cultivos monospóricos

Esta fase del proyecto, está en proceso, el cual consiste en extraer e identificar esporas de los cultivos trampa, se espera determinar a nivel de género y obtener cultivos monospóricos de las especies aisladas.

7.2. Experimento 2. Micorrización de plántulas de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham

7.2.1. Diseño experimental

El diseño experimental es completamente al azar, el cual está conformado por los factores micorrización y fertilización, el primero con tres niveles y el último con dos niveles (3x2=6), para un total de 6 tratamientos ($n = 15$) con un total de 90 plantas en todo el experimento. Los tratamientos a los cuales se les aplicó fertilizante fue

de modo foliar, una cantidad de 0.6 gramos por planta de fertilizante y se seguirá aplicando cada 15 días hasta el término del experimento. El fertilizante usado es FOSFACEL-800 de la fábrica COSMACEL, presenta los siguientes porcentajes de nutrientes; N: 11%, P₂O₅: 58%, L. Aminoácidos: 3%. De igual manera, a dos tratamientos se les aplicó inóculo comercial de un Consorcio micorrízico MTZ1-MICOFER-UV, integrado por las especies: *Acaulospora morrowiae* Spain & Schenck, *Gigaspora albida* Schenck & Smith, *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) (Nicol. & Gerd.) Walker y *Glomus etunicatum* Gerd. & Trappe, *Glomus geosporum* Becker & Gerdemann. La fuente de inóculo fueron raíces de *Brachiaria decumbens* colonizadas en un 94%, el cual fue obtenido en la Universidad Veracruzana, de este se agregó 10 g a cada planta, mientras tanto los dos tratamientos fueron inoculados con suelo rizosférico que únicamente consistió en suelo cernido sin esterilizar (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos a probar en el crecimiento, desarrollo y adquisición de nutrimentos de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham, en la zona sur del estado de Quintana Roo, México.

	Micorrización	Fertilización
Tratamiento 1	Sin micorriza	0
Tratamiento 2	Suelo rizosférico	0
Tratamiento 3	Suelo Comercial	0
Tratamiento 4	Sin micorriza	NPK
Tratamiento 5	Suelo rizosférico	NPK
Tratamiento 6	Suelo Comercial	NPK

7.2.2. Colecta de suelo rizosférico

El día 8 de septiembre de 2016 se realizó una visita al sitio de estudio en el Ejido Sac-Xan, Municipio de Othón P. Blanco, un área donde hay alta abundancia y predominancia de árboles nativos de leucaena, con un alto potencial para encontrar gran diversidad de HMA.

El suelo colectado se realizó en 10 puntos diferentes dentro de la misma área, de aproximadamente 3 hectáreas, los cuales se realizaron a diferentes distancias, es decir, de punto a punto hubo una distancia de 100 metros, en cada punto de recolección se extrajo suelo rizosférico justo debajo de árboles de leucaena recolectando 0.016 m^3 ($0.20 \times 0.40 \times 0.20 \text{ m}$) por punto muestreado.

De igual manera, se colectaron raíces de diferentes árboles de Leucaena, siendo todas estas homogenizadas en una sola muestra. Las cuales fueron enviadas al Centro de Investigación Científico de Yucatán (CICY) para posteriores estudios de biología molecular.

7.2.3. Siembra

En siembra se usó como sustrato el suelo previamente esterilizado y las semillas de *L. leucocphala* cv. Cunningham. Fueron obtenidas con de las parcelas del Instituto Tecnológico de la Zona Maya. La siembra se realizó en charolas forestales previamente esterilizadas con cloro al 10 %.



Figura 6. a) Siembra de la leucaena y b) charola forestal usada para la siembra previamente esterilizada.

Las semillas de la *Leucaena* fueran escarificadas. El método para su escarificación consistió en sumergirlas en agua aproximadamente a 80° C en un periodo de 2-3 minutos, dejándolas enfriar después de este proceso para su siembra (Cervantes *et al.* 1996; citado por Villegas, 2011).

7.2.4. Trasplante de las plántulas

Esta etapa se realizó a los dos meses de la siembra, estas fueron trasplantadas en bolsas de aproximadamente un kilogramo, y fueron establecidas y etiquetadas de acuerdo al tratamiento correspondiente.

7.2.5. Variables de Respuesta

Las variables de respuesta a evaluar fueron las siguientes:

Altura (cm)

La altura se midió con una regla graduada en centímetros, comenzando desde el tronco de la planta o al cuello a ras de suelo, llegando hasta el ápice de la misma.

Diámetro (mm)

Este se midió por medio de un vernier digital con aproximación de mm, se consideró la parte más cercana al suelo es decir el cuello del tallo, la parte intermedia y la parte más cercana al ápice de la misma, y se obtuvo un promedio.

Peso seco (g MS/Planta) y nutrimentos de la planta (%)

En esta etapa se necesitara realizar el sacrificio de algunas plantas para su análisis el cual consiste en separar hojas, tallo y raíz para colocarlas en bolsas de papel para introducirlas por separado en una estufa a 65°C durante 72 horas y luego pesarlos, este proceso se realiza para determinar el pesos seco. De igual manera se determinará el nivel de nitratos, fosfatos y potasio en nuestra planta, para poder tener un resultado que posteriormente serán analizados.

Colonización micorrízica (%)

Se usará el método de clareo y tinción de Philips y Hayman (1970), (anteriormente descrito) para determinar la presencia y porcentaje de colonización micorrízicas.

Composición de especies

Se determinará la composición de especies por medio de revisión de esporas extraídas de los cultivos trampa a través de la técnica de tamizado húmedo y decantación para la separación de esporas del suelo (Gardemann y Nicolson, 1963). De igual manera se espera realizar estudios de biología molecular con la colaboración del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) para determinar las especies y abundancias asociadas a las muestras.

Área foliar (cm²)

Se determinará el área foliar mediante un escáner HP 300 donde se colocará el total de hojas de cinco plantas por tratamiento. Posteriormente, las imágenes de alta resolución (300 dpi) serán analizadas con el Software ImageJ para Windows 10® con el uso del macro LeafJ® para determinar el área foliar por planta.

VIII. RESULTADOS

Experimento 1

Hasta la fecha se logró extraer ADN de las muestras de raíces enviadas al CICY, dichas muestras serán enviadas a Texas para poder obtener secuencias de distintas especies, con la finalidad de identificar la diversidad de especies ubicadas en nuestra región y asociadas a *Leucaena* nativa. Para continuar con los cultivos trampa, serán analizados nuevamente hasta el día 16 de enero del 2017 para verificar si hay algún aumento en su colonización y además iniciar con la extracción de esporas.

En los cultivos trampa de las plantas hasta el momento evaluadas han sido encontradas las siguientes estructuras: vesículas, arbuscúlos e hifas, tanto en raíces de maíz como de *Leucaena*. Fueron reconocidas estructuras completamente formadas en una alta colonización de las raíces (Figura 7).

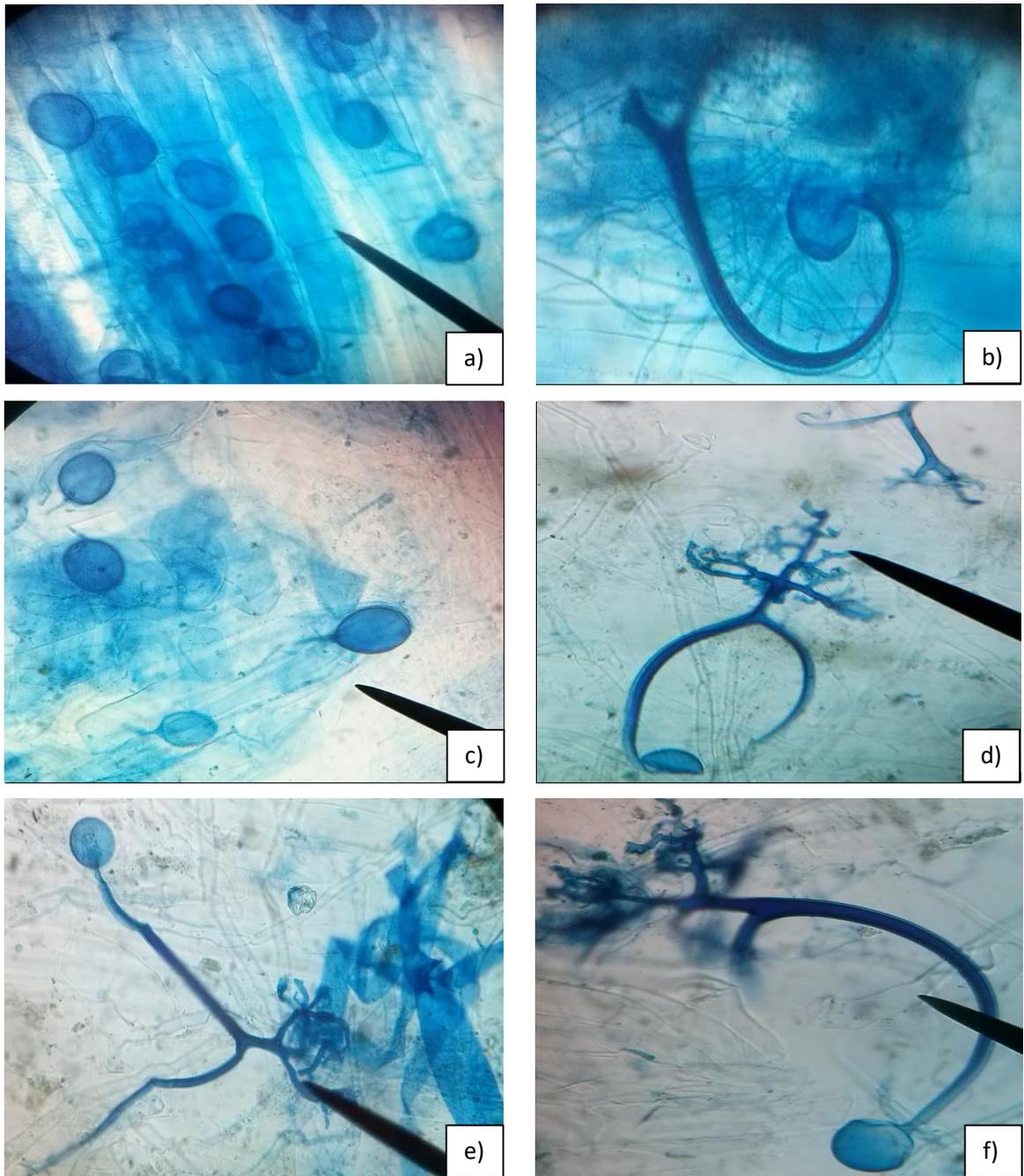


Figura 7. Estructuras de HMA tomadas de las raíces de los cultivos trampa del suelo colectado en *Leucaena leucocephala* en el ejido de Sac-Xan Quintana Roo, México: a) vesículas observadas en raíces donde se usó como cultivo trampa a *L. leucocephala*; b) vesícula e hifa observadas en *Leucaena*; c) vesículas en maíz; d) arbúsculo, vesícula e hifa en maíz; e) arbúsculo, vesícula e hifa en maíz y f) arbúsculo, vesícula e hifa en maíz.

Experimento 2

Hasta el momento se tiene establecido el experimento, en el cual se han tomados datos de altura y diámetro, obteniendo resultados aún no significativos, aunque se percibe una ligera diferencia de altura en el tratamiento testigo, se encuentra rezagado en comparación con los otros tratamientos, aunque su diferencias es mínima, por motivos de tiempo aún está pendiente el análisis del ciclaje de nutrimentos, por lo cual se tiene planeado obtener estos datos y en las próximas etapas (Figura 8).

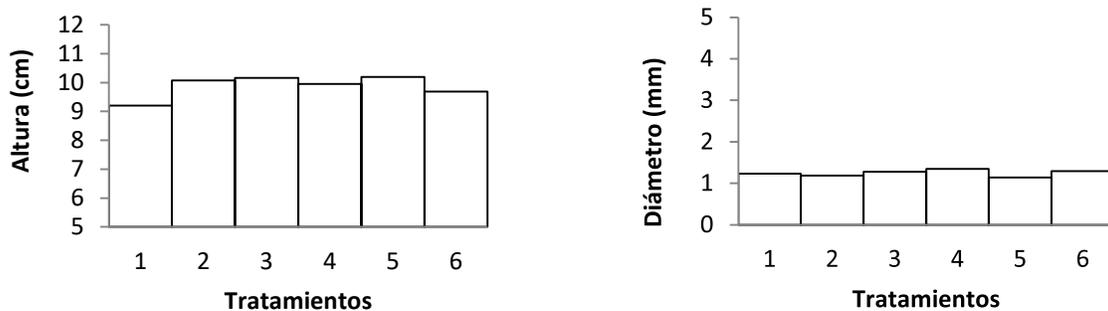


Figura 8. Promedio de altura y diámetro evaluados en las plantas de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham, en la zona sur del estado de Quintana Roo, México: 1) Testigo; 2) Suelo rizosférico; 3) Inóculo Comercial; 4) Fertilizadas con NPK; 5) Suelo rizosférico + NPK y 6) Inóculo comercial + NPK.

IX. CONCLUSIONES

La germinación de las semillas de la variedad nativa de *Leucaena* fue muy baja, debido a que llevaba un periodo prolongado de almacenamiento. Por ello no fue posible evaluar experimentalmente el efecto de la variedad por lo que se atrasó el establecimiento de nuestro experimento principal.

Se lograron determinar algunas estructuras los hongos micorrízicos arbuscular (HMA), como lo son vesículas, arbusculos e hifas, en los cultivos trampa inoculados con suelo rizosférico de la zona sur de Quintana Roo.

Hasta el momento solo se ha logrado evaluar el promedio de altura y diámetro en plantas inoculadas con hongos nativos y con hongos comerciales, faltando varias fechas por analizar en las plantas de *Leucaena leucacephala cv. cunninghamm*.

Se obtuvo una alta colonización de micorrizas en los cultivos trampa, aún falta continuar midiendo el progreso de la inoculación y determinar su caracterización de las micorrizas.

No se logró evaluar los nutrientes de follaje de la *Leucaena leucacephala cv. Cunninghamm*, pero se espera obtener la información en futuras pruebas aun por realizar.

X. COMPETENCIAS APLICADAS O DESARROLLADAS

Se fomenta a desarrollar nuevas tecnologías para el mejoramiento del campo mexicano, siendo pioneros en la investigación para poder llegar a desarrollar productos bio-agrícolas, beneficiando el sector agrícola, pecuario y ecológico como primer fin, aunque estas investigaciones pueden llegar a cubrir otros aspectos.

Otras asignaturas que se aplicaron y seguirán usando es el de taller de investigación, ya que se sigue haciendo una minuciosa investigación de documentos que puedan contribuir en la mejora del nuestro, de igual manera podremos comparar resultados.

Desarrollar procesos productivos dirigidas hacia el campo dando un enfoque holístico y sustentable con todos los recursos que estén a nuestro alcance.

Integrar sistemas de producción a cadenas productivas para poder generar un valor agregado.

Operar y administrar empresas ya sean propias o en sociedad, de igual manera llegar a ser un profesionista que en su trabajo tenga o realice un uso eficiente de los recurso que pueda adquirir y llegue a generar empleos.

XI. REFERENCIAS

- Barros-Rodríguez, M., Solorio-Sánchez, J., Ku-Vera, J., Ayala-Burgos, A., Sandoval-Castro, C., y Solís-Pérez, G. (2012). Productive performance and urinary excretion of mimosine metabolites by hair sheep grazing in a silvopastoral system with high densities of *Leucaena leucocephala*. *Tropical Animal Health & Production*, 44, 1873-1878.
- Bonfante, P., Genre, A. (2008). Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science*, 13: 492–498.
- Camacaro, S., Machado, W. (2005). Producción de biomasa y utilización de *Leucaena leucocephala* fertilizada y pastoreada por ovinos. *Zootecnia Tropical*, 23(2).
- Delgado, D., La, O. O., Congo, B., Galindo, J., Obregón, Y. y Aldama A. (2001). Cinética de la degradación ruminal *in situ* de cuatro árboles forrajeros tropicales; *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Sapindus saponaria*, *Gliricidia sepium*. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*, 35, 141-145.
- Díaz-Cordero, G. (2012). El cambio climático. *Ciencia y Sociedad*, 37: 227-240.
- Fernández-Cruz, E. (2013). Efectividad biológica de especies nativas de hongos micorrízicos arbusculares en Cedro Rojo (*Cedrela odorata* L.). (Tesis Inédita de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Linares, Nuevo León.
- Flores-Bello, M. del R., Aguilar-Espinosa, S., García-Calvario, R., Zamora A., Farias-Larios, J., López-Aguirre, J. G. (2008). Inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y el crecimiento de plántulas de *Leucaena*. *Terra Latinoamericana*, 26: 127-131.
- García D., Wencomo, H., Gonzáles, M., Medina, M. y Cova, L. (2008). Caracterización de diez cultivares forrajeros de *Leucaena leucocephala* basada en la composición química y la degradabilidad ruminal. *Revista MVZ Córdoba*, 13, 1294-1303.

- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963) Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 235-244.
- Guadarrama, P., Álvarez-Sánchez, F.J. (1999). Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, Mexico. *Mycorrhiza*, 8:267-270
- Guerra-Sierra B. E. (2008). Micorriza Arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha*, Vol. 21-1, pp 191-201.
- López-Ortiz, C., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Almaraz, J.J., Martínez-Romero, E., Mendoza-López, M.R. (2012). Establecimiento y respuestas fisiológicas de la simbiosis *Rhizobium tropici-leucaena leucocephala* en presencia de fenantreno y naftaleno. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, 28(4) 333-342.
- Murrieta-Limones, O., (2015). Determinación de la composición nutricional de la *Leucaena leucacephala* cv. *Cunningham* asociada con dos gramíneas en el estado de Quintana Roo. (Informe Técnico de Residencial Profesional). Ejido Juan Sarabia: Instituto Tecnológico de la Zona Maya.
- Monroy-Ata, A., Esteves-Torres, J., García-Sánchez, R. y Ríos-Gómez, R. (2007). Establecimiento de plantas mediante el uso de micorrizas y de islas de recursos en un matorral xerófilo deteriorado. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 80: pp. 49-57.
- Osechas, D., Becerra, L., & Rodríguez, I. (2008). Uso de *Leucaena leucacephala* como recurso forrajero en fincas de doble propósito en del estado de Trujillo, Venezuela. *Agricultura Andina*, 14(1), 49-58.
- Rose, S., Zárate (1987). *Leucaena leucocephala* Publicado en, *Phytologia* 63(4): 304-306. 1987.
- Ruiz, T., & Febles, G. (1987). *Leucaena*. Una opción para la alimentación en el trópico y subtropical. Ed. EDICA Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 200 pp.

- Selthi P., Kulkarni P.P. (1995). *Leucaena leucocephala*, A nutrition bulletin. 16:94.
- Solorio-Sánchez, F., Sandoval-Castro, C., Armendáriz, I. (2003). Manual de manejo agronómico de huaxin (*Leucaena leucocephala*). *Ediciones de la universidad Autónoma de Yucatán. Mérida-Yucatán-México*. pp. 11-15.
- Smith, S.E., Read, D.J. (2008) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Cambridge U.K. 605 pp.
- Vargas-Sanjur, J. I., Estrada-Alvarez, J., & Morales-Londoño, C. S. (2013). Efecto de uso del suelo bajo un sistema silvopastoril estrella (*Cynidon plectostachyus*) y leucaena (*Leucaena leucacephala*) sobre las simbiosis (*Rhizobium*, Micorrizas). *Veterinaria y Zootenia*. 7(2): 28-36.
- Villegas-Velazquez, I. (2011). Respuesta de *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium* y/o Micorriza en diferentes etapas de desarrollo durante la fitorremediación del fenantreno. (Tesis Inédita de Maestría). Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
- Wencomo, H., Lugo, Y. (2013). Rendimiento de materia seca y otros componentes en *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham con el uso del Liplant. *Pastos y Forrajes*, 36(1), 1-12.