

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INFLUENCIA DE MICORRIZAS ARBUSCULARES EN EL DESARROLLO DE
FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) VAR. PINTO AMERICANO BAJO CONDICIONES
DE ESTRÉS

POR

Álvaro Antonio Sánchez Sánchez

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MANEJO Y
ADMINISTRACIÓN DE RECURSOS VEGETALES

2022

**INFLUENCIA DE MICORRIZAS ARBUSCULARES EN EL DESARROLLO DE
FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) VAR. PINTO AMERICANO BAJO -
CONDICIONES DE ESTRÉS**

Comité de Tesis



Dr. Sergio Manuel Salcedo Martínez
Presidente



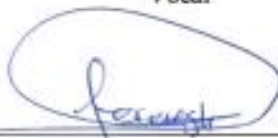
Dr. Marco Antonio Alvarado Vázquez
Secretario



Dr. Jorge Luis Hernández Piñero
Vocal



Dra. Alejandra Rocha Estrada
Vocal



Dr. Rahim Foroughbakhch Pournazeri
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

**INFLUENCIA DE MICORRIZAS ARBUSCULARES EN EL DESARROLLO DE
FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) VAR. PINTO AMERICANO BAJO -
CONDICIONES DE ESTRÉS**

Dirección de Tesis



Dr. Sergio Manuel Salcedo Martínez
Director

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas las bendiciones que ha tenido con mi familia y conmigo.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado durante el periodo 2012-2017.

Esta tesis doctoral es producto también del trabajo y asesoramiento de mi director, Dr. Sergio Moreno Limón Q.E.P.D. le agradezco la dedicación y apoyo incondicional durante todo este tiempo, incluso antes de ser su alumno, gracias por todas aquellas pláticas donde intercambiamos muchos puntos de vista, sé que desde donde se encuentre sigue al pendiente de mí y estoy seguro de que algún día nos volveremos a encontrar.

Así mismo, agradezco al Departamento de Botánica de la UANL, en especial al Dr. Sergio Manuel Salcedo Martínez, Dr. Marco Antonio Alvarado Vázquez, Dr. Jorge Luis Hernández Piñero, Dra. Alejandra Rocha Estrada y Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab por haberme apoyado en la recta final de la escritura de esta tesis, ayudándome también con los trámites administrativos necesarios para llegar a buen término. Gracias.

Mi más sincero agradecimiento a los doctores Juan Antonio Ocampo Bote, Inmaculada García Romera y José García Garrido, por permitirme realizar mi estancia doctoral en el extranjero y con cuyo trabajo y experiencia compartida estaré siempre agradecido, a mis compañeros de laboratorio de la estación experimental del Zaidín, Julia, Luis, Lourdes, Nuria, María Isabel, Luis Martínez. Gracias por todas las enseñanzas, momentos de camaradería y sobre todo por hacerme sentir como en casa durante mi periodo en España.

A mis compañeros y amigos Carlos, Rodrigo, Juan José, Jorge, Oscar, Joel que siempre han estado ahí en los momentos alegres y difíciles y me han brindado su apoyo desde siempre.

Gracias a mi hermosa esposa Alejandra y a mi hijo Alejandro por ser mi inspiración, por su apoyo, paciencia, comprensión y amor durante este proyecto y siempre, los amo.

DEDICATORIA

Con todo cariño para los motores de mi vida

Mis padres

Antonio Sánchez Hernández

María Guadalupe Sánchez Vázquez

Mi hermano

Raúl Jesús Sánchez Sánchez

Mi esposa

Cecilia Alejandra Guerrero Garza

Mi hijo

Alejandro Antonio Sánchez Guerrero

ÍNDICE

Introducción	1
Justificación.....	3
Hipótesis.....	4
Objetivo del trabajo.....	5
Objetivo general	5
Objetivos particulares.....	5
Capitulos	6
Capítulo 1. Aislamiento e identificación de especies de MA asociadas a la rizosfera del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	6
Resumen.....	6
Introducción	7
Material y métodos.....	10
Zona de estudio	10
Diseño de muestreo de suelo.....	10
Aislamiento e identificación de MA	11
Reproducción de MA	11
Resultados	13
Estructura y textura de suelos	13
Aislamiento e identificación de MA	14
Evaluación de la micorrización por los aislamientos de MA y su efecto en fríjol	16
Discusión.....	21
Capítulo 2. Evaluación de la simbiosis de MA nativas con frijol var. Pinto americano y su influencia en el desarrollo fisiológico bajo condiciones de invernadero.....	23
Resumen.....	23

Introducción	24
Material y métodos.....	25
Condiciones experimentales.....	25
Muestreo y análisis de datos	26
Resultados	27
Discusión.....	30
Capítulo 3. Determinación de la influencia de la micorrización en el desarrollo fisiológico de plantas de frijol var. Pinto americano bajo condiciones de estrés hídrico.	32
5.3.1 Resumen.....	32
Introducción	33
Material y métodos.....	35
Bioensayos en invernadero	35
Muestreo y análisis de datos	36
Resultados	37
Discusión.....	40
Capítulo 4. Determinación de la influencia de la micorrización en el desarrollo fisiológico de plantas de frijol var. Pinto americano en suelos contaminados artificialmente con plomo.	42
Resumen.....	42
Introducción	43
Material y métodos.....	45
Bioensayos en invernadero	45
Muestreo y análisis de datos	46
Resultados	47
Discusión.....	50

Capítulo 5. Determinación de la influencia en el desarrollo fisiológico de plantas micorrizadas de frijol var. Pinto Americano en suelos contaminados artificialmente con arsénico.	52
Resumen.....	52
Introducción	53
Material y métodos.....	55
Bioensayos en invernadero	55
Muestreo y análisis de datos	56
Resultados	57
Discusión.....	60
Conclusiones	62
Perspectivas.....	63
Bibliografía	64
ANEXO 1.....	77
ANEXO 2.....	80
ANEXO 3.....	82
ANEXO 4.....	84
ANEXO 5.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los suelos muestreados en las localidades de Axocopan y Coyula, pertenecientes al municipio de Atlixco, Puebla.	13
Tabla 2. Características morfológicas utilizadas para la determinación de la especie de MA presentes en las diferentes muestras de suelo y los resultados obtenidos en las esporas aisladas.	14
Tabla 3. Aislamientos de las distintas muestras de suelo con su identificador interno. ..	15
Tabla 4. Diferencias en PFP entre aislamientos de MA en plantas de frijol.....	17
Tabla 5. Características de los tratamientos utilizados para la prueba de efectividad de la micorrización a nivel de invernadero en plantas de frijol var. Pinto americano.....	25
Tabla 6. LR entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero, mediante el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas ($P=0.561$).	27
Tabla 7. Tratamientos utilizados y especificaciones de cada uno para la prueba de efectividad de la micorrización bajo estrés hídrico a nivel de invernadero en plantas de frijol var. Pinto americano.....	35
Tabla 8. Valores medios obtenidos en abundancia de arbusculos entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	38
Tabla 9. Valores medios obtenidos en intensidad de micorrización entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	39
Tabla 10. Tratamientos utilizados y especificaciones de cada uno para la prueba de efectividad de la micorrización bajo estrés por suelo contaminado con plomo a nivel de invernadero en plantas de frijol var. Pinto americano.....	46
Tabla 11. Valores medios obtenidos en porcentaje de micorrización entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.....	48

Tabla 12. Tratamientos utilizados y especificaciones de cada uno para la prueba de efectividad de la micorrización bajo estrés por suelo contaminado con arsénico a nivel de invernadero en plantas de frijol var. Pinto americano.....56

Tabla 13. Valores medios obtenidos en porcentaje de micorrización entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.....58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de muestreo. Muestreos realizados en la zona de Axocopan y Coyula pertenecientes al municipio de Atlixco, Puebla.	10
Figura 2. Especies de MA identificadas procedentes de las muestras de suelo obtenidas en el estado de Puebla. A. <i>Rhizophagus intraradices</i> ; B. <i>Funneliformis mosseae</i> ; C. <i>Sclerocystis coremioides</i> D. <i>Gigaspora albida</i>	15
Figura 3. Diferencias de altura de las plantas de frijol micorrizadas con los aislamientos de MA.	16
Figura 4. Diferencias de longitud de raíz entre aislamientos de MA en plantas de frijol.	17
Figura 5. Diferencias en peso fresco de raíz entre aislamientos de MA en plantas de frijol.	18
Figura 6. Diferencias en peso seco de parte aérea entre aislamientos de MA en plantas de frijol.	18
Figura 7. Diferencias en biomasa de raíz entre aislamientos de MA en plantas de frijol.	19
Figura 8. Diferencias en porcentaje de micorrización entre aislamientos de MA en plantas de frijol.	19
Figura 9. Diferencias en esporas por 10 gramos de suelo entre aislamientos de MA en plantas de frijol.	20
Figura 10. Diferencias en altura de la planta entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	27
Figura 11. Valores medios obtenidos en peso seco de planta entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	28

Figura 12. Valores medios obtenidos en peso seco de raíz entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	28
Figura 13. Valores medios obtenidos en clorofila (unidades SPAD) entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	29
Figura 14. Valores medios obtenidos en porcentaje de micorrización entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	29
Figura 15. Valores medios obtenidos en peso seco de planta entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	37
Figura 16. Valores medios obtenidos en peso seco de raíz entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	38
Figura 17. Valores medios obtenidos en porcentaje de micorrización entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.	38
Figura 18. Valores medios obtenidos en peso seco de planta entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.....	47
Figura 19. Valores medios obtenidos en peso seco de raíz entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.	48
Figura 20. Valores medios obtenidos en abundancia de arbusculos entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.....	49
Figura 21. Valores medios obtenidos en intensidad de micorrización entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.....	49
Figura 22. Valores medios obtenidos en peso seco de planta entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.....	57
Figura 23. Valores medios obtenidos en peso seco de raíz entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.	58

Figura 24. Valores medios obtenidos en abundancia de arbusculos entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.....59

Figura 25. Valores medios obtenidos en intensidad de micorrización entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.....59

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

MA – Micorrizas arbusculares

AP – Altura de planta

LR – Longitud de raíz

PFP – Peso fresco de planta

PFR – Peso fresco de raíz

PSP – Peso seco de planta

PSR – Peso seco de raíz

A% - Abundancia de arbusculos

M% - Intensidad de la micorrización

RESUMEN

El cultivo del frijol es uno de los más importantes en México, sin embargo, el frijol es una planta muy susceptible a estrés por factores bióticos y abióticos, por lo cual su producción no es constante. Ante esta situación se ha propuesto el uso de microorganismos del suelo para contrarrestar los efectos negativos que provocan los factores abióticos. Dentro de estos microorganismos destacan las micorrizas arbusculares (MA) ya que ayudan a las plantas a utilizar de mejor manera los recursos disponibles y a tolerar condiciones de estrés por sequía o metales pesados. Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron conocer las especies de MA que comúnmente se asocian con las raíces del frijol y determinar si estas MA confieren resistencia a estas plantas frente al estrés hídrico y por los metales pesados plomo y arsénico. Se realizaron muestreos en la zona de Atlixco, Puebla en parcelas de manejo tradicional de frijol localizadas en los ejidos de Axocopan y Coyula. Se muestrearon un total de cinco parcelas donde se identificaron un total de cuatro especies de MA, las cuales se mantuvieron en reproducción utilizando plantas de frijol como huésped. Mediante un diseño al azar y posterior ANOVA y comparación de Tukey en cámaras de crecimiento e invernadero se determinó que la mejor MA era M4_RI (*Rhizophagus intraradices*). Posteriormente, se evaluó por separado la eficiencia de la micorrización M4_RI - Frijol en condiciones de estrés hídrico y por los metales pesados plomo y arsénico. En los tres experimentos se utilizó un diseño factorial al azar y posterior ANOVA y comparación de Tukey, donde se midieron las variables de peso seco de planta y raíz, así como, el porcentaje e intensidad de la micorrización y abundancia de arbusculos. Los resultados obtenidos demostraron en líneas generales que las plantas micorrizadas producen una mayor biomasa que sus contrapartes no micorrizadas independientemente del volumen de riego o de las concentraciones de metales pesados; además se demostró que la abundancia de arbusculos tiene efectos positivos en el establecimiento de plantas de frijol en las condiciones de estrés abiótico evaluadas en esta investigación. Se propone al aislamiento M4_RI como una MA con potencial para ser probada en experimentos en campo y determinar su viabilidad para ser utilizada como un producto comercial específico para el cultivo de frijol.

ABSTRACT

Bean is one of the most important crops in Mexico; however, beans are a plant very susceptible to stress by biotic and abiotic factors, so its production is not constant. In view of this situation, the use of soil microorganisms has been proposed to counteract the negative effects caused by abiotic factors. Among these microorganisms, arbuscular mycorrhizae (AM) stand out because they help plants to make better use of available resources and to tolerate stress conditions due to drought or heavy metals. Therefore, the objectives of this research were to know the AM species that are commonly associated with bean roots and to determine if these AMs confer resistance to these plants against water stress and the heavy metals lead and arsenic. Sampling was carried out in the area of Atlixco, Puebla in plots of traditional bean management located in the ejidos of Axocopan and Coyula. A total of five plots were sampled where a total of four species of AM were identified, which were maintained in reproduction using bean plants as host. By a randomized design and subsequent ANOVA and Tukey's comparison in growth chambers and greenhouse, it was determined that the best AM was M4_RI (*Rhizophagus intraradices*). Subsequently, the efficiency of M4_RI - Bean mycorrhization was evaluated separately under conditions of water stress and heavy metals lead and arsenic. In the three experiments, a randomized factorial design was used, followed by ANOVA and Tukey's comparison, where the variables of plant and root dry weight, as well as the percentage and intensity of mycorrhization and abundance of arbuscules were measured. The results obtained showed in general terms that mycorrhized plants produce a higher biomass than their non-mycorrhized counterparts regardless of irrigation volume or heavy metal concentrations; in addition, it was demonstrated that the abundance of arbuscules has positive effects on the establishment of bean plants under the abiotic stress conditions evaluated in this research. Isolate M4_RI is proposed as an AM with potential to be tested in field experiments to determine its viability for use as a commercial product specifically for bean cultivation.

INTRODUCCIÓN

En México el frijol posee una amplia importancia cultural y gastronómica, alrededor del 60% de los platillos culinarios contienen esta leguminosa, y junto con el maíz y el chile forman la base de la alimentación de los mexicanos desde épocas prehispánicas.

El frijol se cultiva prácticamente en todo el territorio mexicano, destacando los estados de Zacatecas, Durango, Chihuahua, Sinaloa y Chiapas, los cuales generan más de la mitad del total de la producción nacional. Monetariamente este cultivo provee una derrama económica importante para el campo mexicano con más de nueve mil millones de pesos en valor de producción, a esto se le suma el valor económico por actividades en los distintos niveles de producción y comercio.

Sin embargo, el cultivo de frijol enfrenta distintos retos, por una parte, es un cultivo de temporal, es decir los productores dependen de las lluvias para poder obtener una buena cosecha, lo cual hace que se comprometan los rendimientos esperados del cultivo ya que en los últimos años se han prolongado los periodos de sequía, y las lluvias, cuando las hay, son escasas y es una tendencia que va en aumento en gran parte del país. A lo anterior se le añade la calidad decreciente de los suelos los cuales se ven disminuidos en nutrientes necesarios para el desarrollo de plantas y la permanencia de distintos contaminantes que afectan la productividad, siendo los más comunes los metales pesados.

El segundo factor que considerar es la demanda creciente que hay en el país de frijol, lo cual ha hecho que México sea un importador neto, esto significa que el país no produce la cantidad necesaria de frijol para suplir la demanda nacional.

Lo anterior provoca que el precio de compra del frijol varíe considerablemente y ante esta inestabilidad en los precios muchos de los productores desisten de esta actividad económica, lo cual compromete aún más la producción de este alimento.

En tiempos recientes se han promovido prácticas de agricultura sustentable con el fin de dar una solución a problemáticas como la escasez de agua, disminución de uso de insecticidas y fertilizantes, mitigar el efecto nocivo de los contaminantes del suelo, etc. Una de las alternativas que tiene más demanda dentro de la agricultura sustentable es el uso de biofertilizantes a base de microorganismos, hongos o bacterias, presentes en el

suelo que se asocian a las plantas directa o indirectamente y que han demostrado que juegan un papel importante en el aprovechamiento de los recursos propios del suelo y en el uso eficiente del agua.

Dentro de este trabajo se exploran los hongos micorrízicos presentes naturalmente en la rizosfera de frijol cultivado en suelos no tecnificados del estado de Puebla, y mediante experimentos a nivel de invernadero se determina la influencia de la interacción MA-Frijol bajo condiciones de estrés hídrico y de contaminación de suelo con plomo y arsénico. Lo anterior con el fin de aportar conocimiento que genere valor y alternativas para contrarrestar parte de la problemática que conlleva la producción y comercialización de frijol en nuestro país.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha propuesto el uso de diferentes biotecnologías con el fin de aumentar la producción de los cultivos mediante el uso eficiente de agua y recursos minerales presentes en el suelo cultivable. Dentro de estas tecnologías destaca el uso de hongos micorrízicos arbusculares que se asocian directamente a la raíz de las plantas y les proveen de diferentes beneficios.

En la actualidad es amplio el conocimiento sobre las interacciones planta-bacteria en la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* y todas las implicaciones que esto conlleva en la dinámica ecológica entre este tipo de simbiosis, sin embargo, es poco lo que se conoce sobre las MA que se asocian al frijol y el papel que juegan estos microorganismos en el desarrollo fisiológico de la planta ante situaciones de estrés.

Por lo anterior en este trabajo se planteó como objetivo conocer que MA se asociaban frecuentemente a la raíz de frijol, aislar esas MA, reproducirlas y posteriormente evaluar la interacción simbiótica y su efecto en el desarrollo fisiológico de frijol var. Pinto americano en condiciones de estrés hídrico y por metales pesados.

HIPÓTESIS

Las especies de hongos micorrízicos presentes en la rizosfera de las plantas de frijol le confieren un beneficio en cuanto a su desarrollo fisiológico en condiciones de estrés hídrico y estrés por metales pesados.

OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo general

Determinar la influencia de las micorrizas arbusculares en el desarrollo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Pinto americano en condiciones de estrés hídrico y por los metales pesados plomo y arsénico.

Objetivos particulares

Aislar e identificar especies de MA asociadas a la rizosfera del frijol a partir de muestras de suelo agrícola de la zona productora del estado de Puebla, México.

Reproducir MA aisladas de muestras agrícolas y evaluar la respuesta en crecimiento de plantas micorrizadas de frijol var. Pinto americano bajo condiciones controladas.

Determinar la influencia en el desarrollo fisiológico de plantas micorrizadas de frijol var. Pinto americano bajo condiciones de estrés hídrico.

Evaluar la influencia en el desarrollo fisiológico de plantas micorrizadas de frijol var. Pinto americano en suelos contaminados artificialmente con plomo.

Determinar la influencia en el desarrollo fisiológico de plantas micorrizadas de frijol var. Pinto americano en suelos contaminados artificialmente con arsénico.

CAPITULOS

Capítulo 1. Aislamiento e identificación de especies de MA asociadas a la rizosfera del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Resumen

El cultivo del frijol es uno de los más importantes en México, sin embargo, el frijol es una planta muy susceptible a factores bióticos y abióticos.

En años recientes se ha propuesto el uso de biofertilizantes, microorganismos del suelo que se asocian con las plantas, como una forma de contrarrestar los efectos negativos que provocan los factores abióticos en los cultivos. Dentro de los biofertilizantes destacan las MA ya que se ha demostrado que ayudan a las plantas a utilizar de mejor manera los recursos disponibles en el suelo.

Son pocos los estudios que nos permiten conocer la composición de la microbiota presente en los suelos cultivables, por lo cual en esta investigación se realizaron muestreos dirigidos en la zona de Atlixco, Puebla en huertas de manejo tradicional de frijol localizadas en los ejidos de Axocopan y Coyula. Se muestrearon un total de cinco parcelas donde se cultivaba frijol var. Pinto. En cada una de las parcelas se colectaron muestras de suelo y se llevaron a laboratorio para procesarse.

Las esporas presentes en las muestras de suelo se separaron mediante tamizado húmedo y decantado y se observaron al estereoscopio y microscopio. Se identificaron morfológicamente un total de cuatro especies: *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae*, *Sclerocystis coremioides* y *Gigaspora albida*. Cada aislamiento se realizó separando el origen de la muestra y la especie encontrada en cada uno.

Se realizó un diseño experimental al azar para evaluar los aislamientos, los resultados obtenidos en las variables fisiológicas y de micorrización medidas se analizaron por ANOVA de una vía y posteriormente por comparación de medias Tukey ($p=0.05$). Se encontraron diferencias significativas ($p<0.001$) entre las variables. Los aislamientos a base de *R. intraradices* obtuvieron los mejores resultados.

Introducción

La planta de frijol es una enredadera que alcanza entre cincuenta y setenta centímetros de altura. Sus raíces están bien desarrolladas, con una principal o pivotante y muchas otras secundarias; presenta tallos delgados y débiles, a veces rayados de púrpura. Sus hojas son trifoliadas, con bordes ovales y la flor con estandarte redondeado. El fruto es una vaina suavemente curvada y dehiscente que puede medir de 10 a 12 centímetros y es de color verde morado o casi negra. En su interior, las semillas pueden ser oblongas, ovales o redondeadas, poco comprimidas y de color rojo, amarillo, café o negro (**SIAP, s.f.**).

La planta es muy susceptible a condiciones extremas. Se ve afectada tanto por el exceso como por la falta de humedad. La temperatura óptima va de 10 a 27°C y se debe sembrar en suelos de textura ligera, sin encharcamientos. La planta prefiere los suelos neutrales, aunque se comporta bien en los suelos ligeramente ácidos. Necesitan mucha luz solar para conferir calidad al fruto, aunque el tallo resulta afectado con el sol excesivo. Se necesitan regar con frecuencia, sobre todo en épocas de mucho calor, para obtener las mejores semillas (**SIAP, s.f.**).

Dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) corresponde a una de las más importantes. Actualmente está distribuido en todo el mundo y es un componente esencial de la dieta, principalmente en Centroamérica y Sudamérica (**Ulloa et al. 2011**), donde México se ha reconocido como el más probable centro de origen, o al menos como el centro primario de diversificación (**Ulloa et al. 2011; CONABIO s.f.**).

La distribución del frijol en México como producto agrícola importante se reporta en Chiapas, Colima, Durango, Jalisco, Morelos, Nayarit, Puebla, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (**Villaseñor y Espinosa, 1998**). Para el año 2011 el valor de la producción de frijol alcanzó una cifra de 6,889 millones de pesos (**SIAP, s.f.**).

Debido a la susceptibilidad de la planta de frijol a condiciones de estrés biótico y abiótico, en años recientes se ha querido encontrar el biofertilizante idóneo para este cultivo. Un biofertilizante se define como todo aquel organismo o microorganismo que ayuda a la planta a obtener y/o procesar nutrientes minerales que están presentes en el suelo (**Alarcón**

y Ferrera, 2000), Estos biofertilizantes se pueden aplicar a la semilla o al suelo con el fin de incrementar su número, asociarse directa o indirectamente al sistema radical de las plantas, favorecer su interacción e incrementar el desarrollo vegetal y reproductivo de la planta huésped (Aguirre *et al.* 2009).

Se pueden distinguir dos tipos principales de biofertilizantes; los biofertilizantes de tipo bacteriano (*Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, etc.) y los biofertilizantes a base de esporas de hongos dentro de las cuales se encuentran las llamadas micorrizas arbusculares (MA), las cuales suelen ser más resistentes a las condiciones ambientales que las bacterias (INVAM, 2011).

Las micorrizas tienen una amplia distribución geográfica (Mosse, 1973), están presentes en todos los continentes y en la mayoría de los ecosistemas terrestres (Hall, 1979).

De acuerdo con la formación de sus estructuras, dentro o fuera de la planta, se han descrito siete tipos siguiendo criterios estructurales, funcionales y taxonómicos y estos tipos son: ectomicorrizas, endomicorrizas o micorrizas arbusculares, ectoendomicorrizas, arbutoides, monotropoides, ericoides y orquidioides (Aguirre *et al.* 2009).

Los hongos micorrízicos más utilizados como biofertilizante son los de tipo endomicorrizas o también llamados MA que tienen la propiedad de penetrar la corteza de la raíz y son capaces de explorar mayor volumen de suelo y llegar a sitios inalcanzables para la raíz (Alarcón y Ferrera, 2000).

Las endomicorrizas se agrupan en el filo Glomeromycota, clase Glomeromycetes, en el cual se encuentran 4 órdenes: Archaeosporales con 3 familias (Ambisporaceae, Archaeosporaceae y Goesiphonaceae), Glomerales con 2 familias (Claroideoglomeraceae, Glomeraceae), Diversisporales con 5 familias (Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae, Pacisporaceae, Sacculosporaceae), Paraglomerales con 2 familias (Paraglomeraceae, Pervetustaceae), dando en conjunto un total de 37 géneros y 315 especies (Schüßler y Walker 2010).

El ciclo de vida de las MA inicia con la germinación en el suelo de las esporas que crecen al azar en busca de una raíz susceptible a ser colonizada, es decir, requieren de un sistema radical vivo para completar su ciclo biológico, por lo que se consideran simbioses

obligados. Las MA forman simbiosis con el 80% de las familias de plantas, excepto las familias de plantas: Chenopodiaceae, Cruciferaeae, Fumariaceae, Cyperaceae, Commelinaceae, Urticaceae y Polygonaceae (**Gerdemann, 1975; Olalde y Serratos, 2004; HaiRu et al. 2012**).

Las MA juegan un papel importante en la absorción de fósforo (P) y zinc (Zn) en diferentes cultivos. Además, inducen resistencia contra las enfermedades transmitidas por el suelo y de manera foliar, también mejoran las características físicas del suelo y proveen una mayor tolerancia a la sequía y al estrés salino. Todas estas características son importantes para que la agricultura se desarrolle con éxito en condiciones semiáridas (**Raviv, 2010**).

Material y métodos

Zona de estudio

La zona de estudio se delimitó al municipio de Atlixco en el estado de Puebla, México. Este municipio es privilegiado ya que se encuentra en medio de dos valles, hacia el Noroeste se encuentra el valle de Puebla y hacia el este el valle de Atlixco. Atlixco se encuentra en la falda del volcán Popocatepetl por lo cual el suelo es rico en materia orgánica, cuenta con una altitud promedio de 1840 msnm (Figura 1). Se seleccionaron cinco sitios de estudio al azar en parcelas ubicadas sobre la carretera dirección Axocopan-Coyula, las parcelas seleccionadas se cultivaban de manera artesanal, es decir, no se utilizaba maquinaria, fertilizantes o insecticidas químicos, lo cual garantizaba que se encontraran una amplia variedad de especies de MA presentes en el suelo.

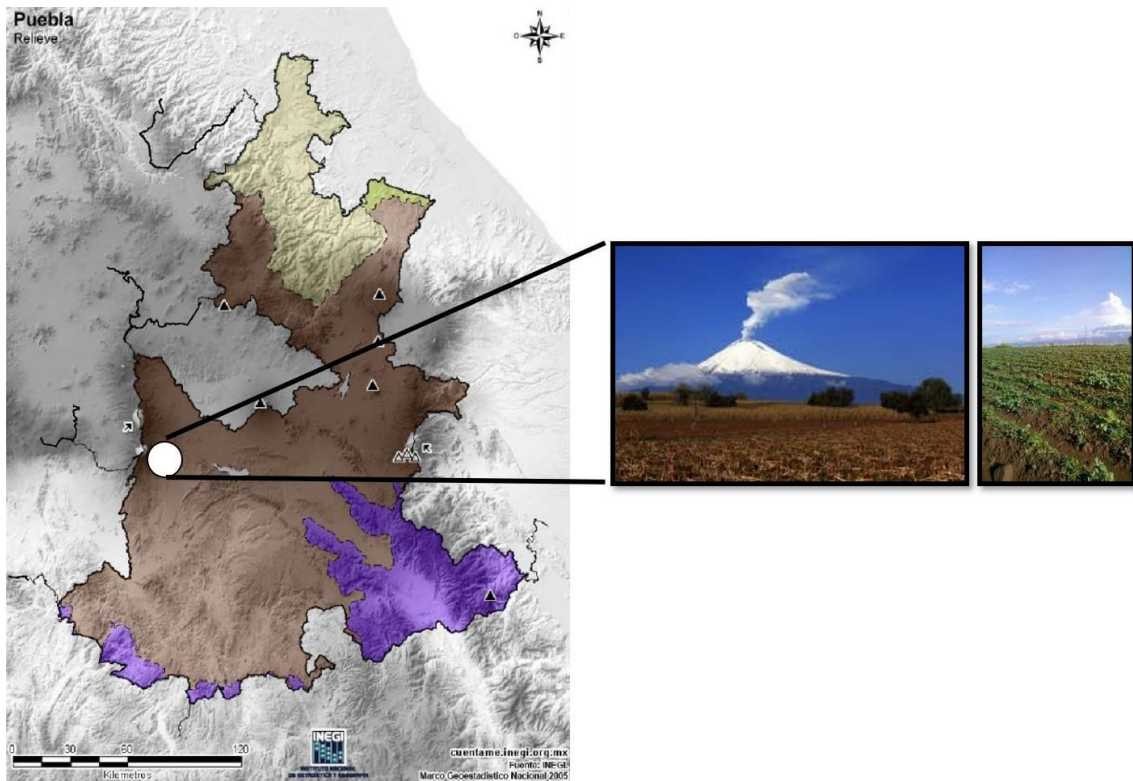


Figura 1. Área de muestreo. Muestras realizadas en la zona de Axocopan y Coyula pertenecientes al municipio de Atlixco, Puebla.

Diseño de muestreo de suelo

Se colectaron muestras compuestas de suelo de cada una de las parcelas seleccionadas. Para lo anterior en cada una de las parcelas se realizó un muestreo dirigido escogiendo

cuatro puntos en los cuales mediante inspección visual se determinó que el grado de desarrollo fisiológico del frijol era mayor en esa zona en comparación con el resto de la huerta. De cada una de esas áreas se tomó una muestra de ½ kg de suelo del perfil B junto con raíces de las plantas que se encontraban a su alrededor. Al final del muestreo se obtuvo una muestra compuesta de dos kilogramos por cada parcela muestreada, dando un total de diez kilogramos al final del muestreo. Se realizó la caracterización fisicoquímica del suelo de las muestras obtenidas en campo, este procedimiento se realizó en la estación experimental del Zaidín, dentro del análisis de caracterización del suelo se midieron el porcentaje de materia orgánica, contenido de nitrógeno, fósforo y potasio, pH y textura.

Aislamiento e identificación de MA

El aislamiento de esporas de MA se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por **Gerdemann y Nicolson 1963**.

Las esporas aisladas se observaron al estereoscopio y al microscopio con el fin de observar las características morfológicas de cada una. El suelo sobrante se almacenó a 4°C en bolsas tipo ziploc.

La identificación taxonómica se basó en la morfología de las esporas utilizando la guía descriptiva de la International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi, INVAM, además se utilizaron las claves taxonómicas de **Schenk y Pérez 1990**. Las características morfológicas que permitieron una correcta identificación fueron: forma de la espora, diámetro ecuatorial, diámetro meridional, color de espora, tipo de inserción de la hifa en la espora, estructura de la pared de la espora y número de capas de la pared de la espora.

Reproducción de MA

Para reproducir las MA las especies identificadas se separaron por especie y sitio de colecta de procedencia y a esto se le denominó “aislamiento” y se les asignó una clave. Todas las esporas de cada aislamiento se colocaron en macetas de 1 kg con mezcla de suelo-arena (2:3) previamente esterilizado; en cada una de las macetas se sembraron 3 semillas desinfectadas de frijol var. Pinto americano y se colocaron en una cámara de crecimiento a 24°C con 12/12 horas luz/oscuridad. La disposición de las macetas en la cámara de crecimiento fue al azar.

Se dejaron crecer las plantas de frijol hasta que completaran su ciclo fisiológico para posteriormente retirar la parte aérea y volver a sembrar. Este procedimiento se realizó en total por tres ciclos fisiológicos de frijol. Al final del tercer ciclo se procesaron las muestras para estimar la reproducción de los aislamientos.

Se midieron las siguientes variables fisiológicas: AP, LR, PFP, PSP, PFR y PSR.

Para medir la colonización, se tiñeron las raíces utilizando la metodología propuesta por **Phillips y Hayman 1970**. Posteriormente se midió la micorrización en porcentaje utilizando el método de “presencia o ausencia de infección en el segmento total de la raíz” propuesto por **Hayman 1970**.

Adicionalmente se determinó el número de esporas por cada 10 gramos de suelo de cada uno de los aislamientos, las esporas se separaron utilizando una modificación al método de tamizado y decantación según **Gerdemann y Nicolson 1963**. Para realizar el conteo se partió de 250 g de suelo disueltos en un litro de agua corriente, posteriormente la suspensión se pasó por tamices de 500, 250, 150 y 40 micras de apertura, a continuación, se colectaron 40 ml de los últimos dos tamices y se contó el número de esporas presente en 5 ml para posteriormente escalar el número de esporas a un litro y dividirlo entre el número de gramos que se utilizaron en la disolución, para esta investigación 250 g. Lo anterior se resume en la siguiente fórmula:

$$((\text{Número de esporas contadas en 5ml}) / (5)) / (250)) (10)$$

Los datos recabados de los diferentes parámetros analizados se sometieron a un análisis ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$).

El análisis de los resultados de crecimiento de frijol permitió hacer una selección para determinar los aislamientos de MA que se escalaron a pruebas en invernadero.

Resultados

Estructura y textura de suelos

Los suelos colectados presentaron un alto porcentaje de materia orgánica y contenido de potasio. Destaca la alcalinidad del suelo. Todos los suelos muestreados presentaron textura arcillo arenoso (tabla 1).

Tabla 1. Composición de los suelos muestreados en las localidades de Axocopan y Coyula, pertenecientes al municipio de Atlixco, Puebla.

Muestra	Materia Orgánica (%)	Nitrógeno (%)	Fósforo (ppm)	Potasio (ppm)	pH	Textura	Localidad
1	18.7	0.22	40.3	210	8.2	Arcillo arenoso	Axocopan
2	32.5	0.18	38.5	189.7	8.6	Arcillo arenoso	Axocopan
3	40.3	0.16	32.4	225.8	8.5	Arcillo arenoso	Axocopan
4	25.7	0.24	41.2	224.9	7.9	Arcillo arenoso	Coyula
5	31.3	0.18	39.3	215.6	8.6	Arcillo arenoso	Coyula

En la tabla 2 se observan las características morfológicas y las mediciones realizadas de las esporas aisladas de las distintas localidades de estudio. *Rhizophagus intraradices* fue la especie de MA identificada que se encontró presente en todas las muestras analizadas. *Gigaspora albida* fue la segunda especie identificada con mayor frecuencia, *Funneliformis mosseae* solo se identificó en un sitio de muestreo.

Aislamiento e identificación de MA

Tabla 2. Características morfológicas utilizadas para la determinación de la especie de MA presentes en las diferentes muestras de suelo y los resultados obtenidos en las esporas aisladas.

*G-S=Globosa, subglobosa; E=Elíptica

Muestra	Color	Forma*	Diámetro Ecuatorial (µm)	Diámetro Meridional (µm)	Inserción de la hifa	Pared de la spora	Capas de la pared de la spora	ID especie	Localidad
1	Café, amarillo	G-S, E	105.1 ± 0.2	104.47 ± 0.5	Simple	Sin irregularidades	3	<i>Rhizophagus intraradices</i>	Axocopan
	Hialino, crema	G-S	211.2 ± 0.3	207.9 ± 0.7	Bulbo, célula esporógena	Sin irregularidades	3	<i>Gigaspora albida</i>	Axocopan
2	Café, amarillo	G-S, E	120.2 ± 0.5	122.1 ± 0.5	Simple	Sin irregularidades	3	<i>Rhizophagus intraradices</i>	Axocopan
	Café oscuro	E	150.4 ± 0.6	152.8 ± 0.7	n/a	Irregular	1	<i>Sclerocystis coremioides</i>	Axocopan
	Café, amarillo	G-S	180.7 ± 0.6	174.3 ± 0.7	Septo	Irregular	3	<i>Funneliformis mosseae</i>	Axocopan
3	Naranja, rojizo	E	114.5 ± 0.5	110.8 ± 0.6	n/a	Irregular	1	<i>Sclerocystis coremioides</i>	Axocopan
	Café oscuro	G-S, E	92.3 ± 0.5	93.7 ± 0.8	Simple	Sin irregularidades	3	<i>Rhizophagus intraradices</i>	Axocopan
4	Café, amarillo	G-S, E	132.5 ± 0.5	130.2 ± 0.8	Simple	Sin irregularidades	3	<i>Rhizophagus Intraradices</i>	Coyula
	Amarillo, hialino	G-S	231.4 ± 0.6	235.5 ± 0.3	Bulbo, célula esporogena	Sin irregularidades	3	<i>Gigaspora albida</i>	Coyula
5	Naranja rojizo	G-S, E	122.7 ± 0.6	120.4 ± 0.3	Simple	Sin irregularidades	3	<i>Rhizophagus intraradices</i>	Coyula
	Amarillo, hialino	G-S	223.3 ± 0.6	218.6 ± 0.5	Bulbo, célula esporogena	Sin irregularidades	3	<i>Gigaspora albida</i>	Coyula

En la figura 2 se puede observar al detalle la morfología de algunas de las especies que se identificaron. Como se puede observar *Sclerocystis coremioides* es una especie que se presenta en esporocarpio, en la Figura 2C se observa la disposición de las esporas dentro del esporocarpio. En la Figura 2D se observa el bulbo en la inserción de la hifa característico de la especie *Gigaspora albida*.

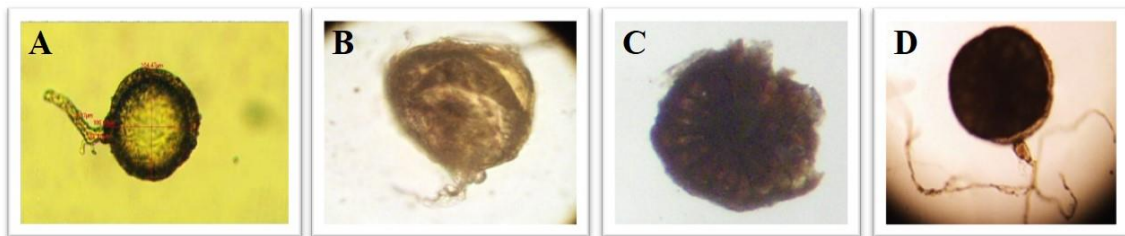


Figura 2. Especies de MA identificadas procedentes de las muestras de suelo obtenidas en el estado de Puebla. A. *Rhizophagus intraradices*; B. *Funneliformis mosseae*; C. *Sclerocystis coremioides* D. *Gigaspora albida*.

Se obtuvieron 11 aislamientos en total de 4 especies en las 5 muestras de suelo colectadas. A cada uno de los aislamientos se les asignó una clave dependiendo de la especie y el lugar de colecta como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Aislamientos de las distintas muestras de suelo con su identificador interno.

Muestra	Especie	Identificador
1	<i>Rhizophagus intraradices</i>	M1_RI
1	<i>Gigaspora albida</i>	M1_GA
2	<i>Funneliformis mosseae</i>	M2_FM
2	<i>Rhizophagus intraradices</i>	M2_RI
2	<i>Sclerocystis coremioides</i>	M2_SC
3	<i>Rhizophagus intraradices</i>	M3_RI
4	<i>Gigaspora albida</i>	M4_GA
4	<i>Rhizophagus intraradices</i>	M4_RI
5	<i>Rhizophagus intraradices</i>	M5_RI
5	<i>Gigaspora albida</i>	M5_GA
5	<i>Sclerocystis coremioides</i>	M5_SC

Evaluación de la micorrización por los aislamientos de MA y su efecto en fríjol

En el anexo 1 se pueden consultar las tablas ANOVA y las tablas de comparación de medias.

Los resultados mostraron que existen diferencias significativas ($P < 0.001$) en la variable de altura de la planta entre los distintos aislamientos, en la figura 3 se observan las diferencias en AP (45 dds), los aislamientos M4_RI, M5_RI y M2_SC obtuvieron los valores medios más altos; contrario a los aislamientos M1_RI, M2_FM, M2_RI, M3_RI y M5_GA que obtuvieron los valores medios más bajos.

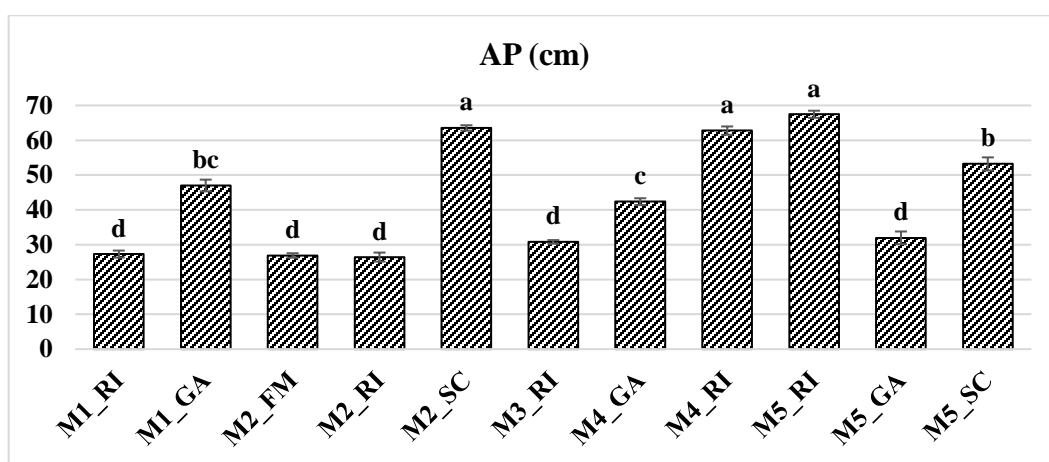


Figura 3. Diferencias de altura de las plantas de frijol micorrizadas con los aislamientos de MA.

En cuanto a la LR el aislamiento M4_RI se diferenció estadísticamente del resto ($P < 0.001$) de los aislamientos, obteniendo el valor medio más alto en esta variable, por otra parte, M2_RI presentó el valor medio más bajo de LR (figura 4).

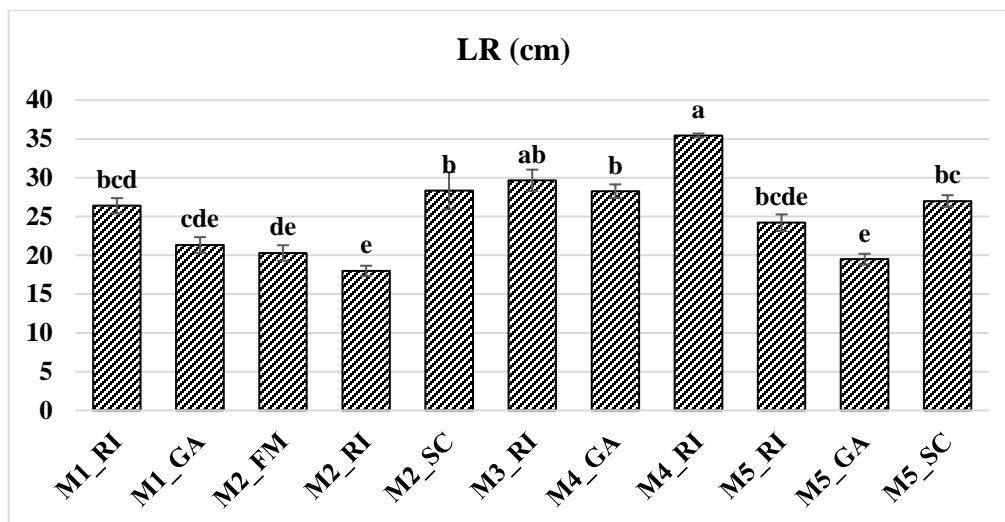


Figura 4. Diferencias de longitud de raíz entre aislamientos de MA en plantas de frijol.

Contrario a los resultados anteriores, en el PFP el aislamiento M2_RI se diferenció estadísticamente del resto de aislamientos ($P < 0.001$). M5_SC de *S. coremioides* obtuvo el valor medio más bajo (Tabla 4).

Tabla 4. Diferencias en PFP entre aislamientos de MA en plantas de frijol.

Aislamiento	PFP (g)
M1_RI	3.52 ± 0.065 bc
M1_GA	4.12 ± 0.200 bc
M2_FM	4.27 ± 0.085 abc
M2_RI	5.49 ± 0.125 a
M2_SC	3.85 ± 0.225 bc
M3_RI	4.17 ± 0.135 bc
M4_GA	4.61 ± 0.390 ab
M4_RI	3.58 ± 0.225 bc
M5_RI	4.56 ± 0.080 ab
M5_GA	4.67 ± 0.315 ab
M5_SC	3.22 ± 0.280 c

En la figura 5 se observan las diferencias entre el PFR, el aislamiento M5_RI obtuvo el mayor valor y se diferenció estadísticamente del resto de aislamientos ($P < 0.001$).

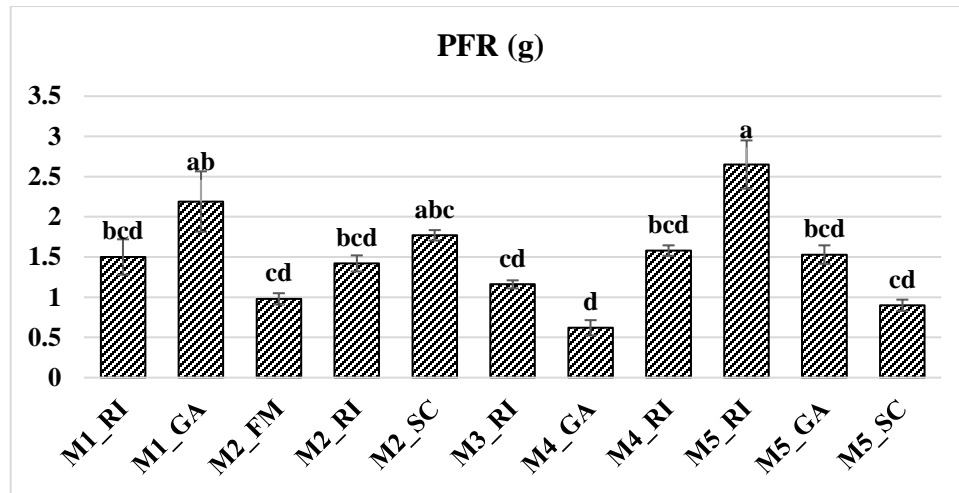


Figura 5. Diferencias en peso fresco de raíz entre aislamientos de MA en plantas de frijol.

En la figura 6 se observan las diferencias en PSP. M2_FM (*F. mosseae*) y M4_GA (*G. albida*) fueron los aislamientos con mayores valores de este parámetro y tuvieron una diferencia significativa con del resto de aislamientos ($P < 0.012$).

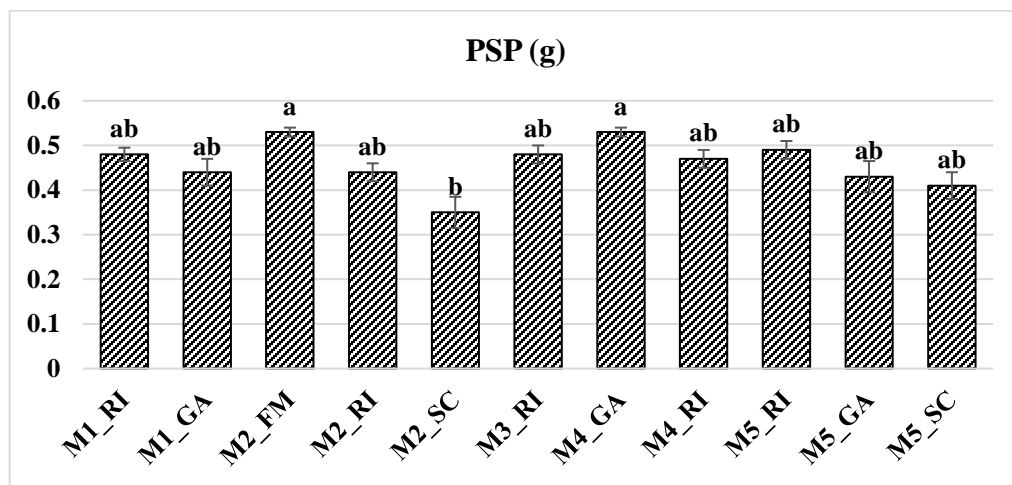


Figura 6. Diferencias en peso seco de parte aérea entre aislamientos de MA en plantas de frijol.

En la figura 7 se observa que en cuanto a PSR, el aislamiento que se diferenció del resto fue el M1_GA. En el resto de los aislamientos no hubo diferencias significativas ($P < 0.001$).

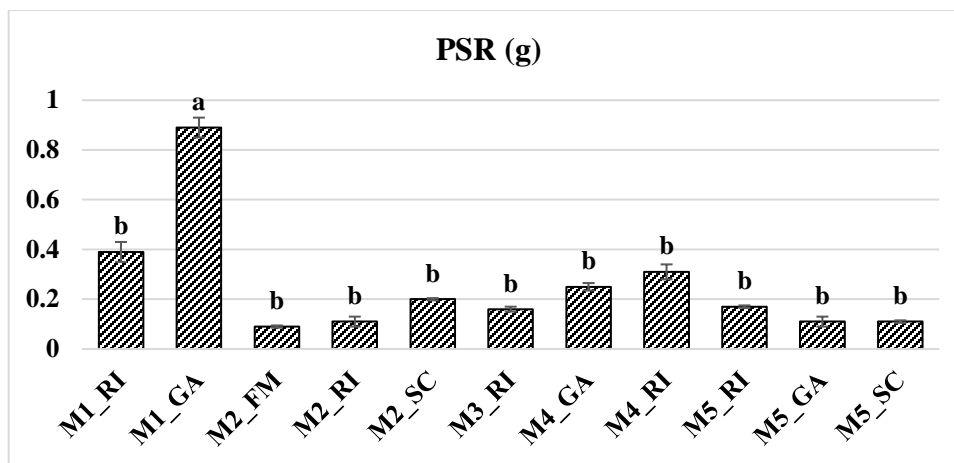


Figura 7. Diferencias en biomasa de raíz entre aislamientos de MA en plantas de frijol.

El porcentaje de micorrización fue significativamente mayor en los aislamientos de *R. intraradices* ($P < 0.001$) destacando el aislamiento M3_RI que obtuvo el valor medio más alto con 84%, por el contrario, el aislamiento M2_SC de *S. coremioides* obtuvo el menor valor de micorrización con 54% (figura 8).

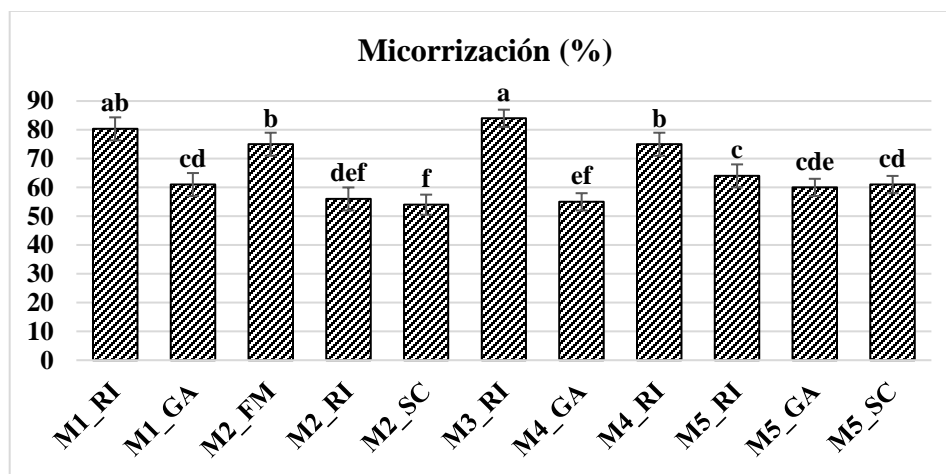


Figura 8. Diferencias en porcentaje de micorrización entre aislamientos de MA en plantas de frijol.

Se presentaron diferencias significativas ($P < 0.001$) en el conteo de esporas por 10 g de suelo. El aislamiento M1_RI obtuvo el mayor número de esporas con 31, en tanto que los valores más bajos fueron de los aislamientos M1_GA, M2_RI y M5_GA con 4.33 esporas por gramo (figura 9).

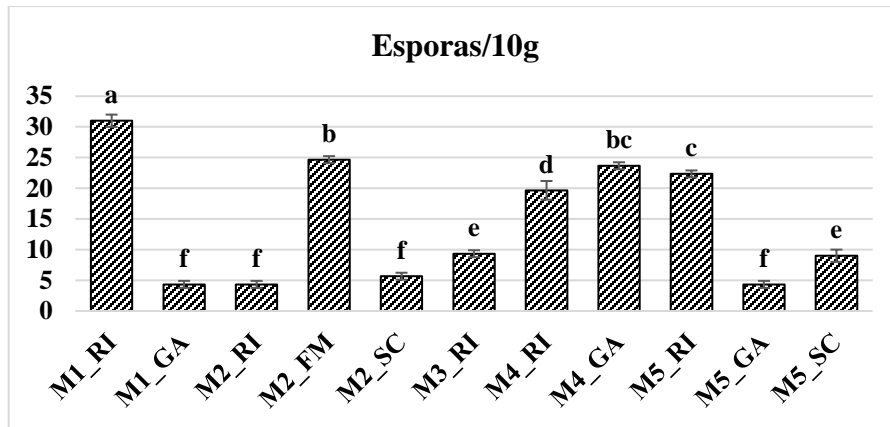


Figura 9. Diferencias en esporas por 10 gramos de suelo entre aislamientos de MA en plantas de frijol.

Discusión

Existen 315 especies clasificadas dentro de las MA, si bien dentro de este estudio se esperaba encontrar una alta diversidad de MA, solo se identificaron 4 especies. Son pocas las referencias que existen donde se explore la diversidad de especies de MA en leguminosas y casi nulos en frijol, por lo tanto, las especies aquí descritas aportan nuevo conocimiento sobre el microbiota presente en *P. vulgaris*.

Diversos autores han demostrado que la diversidad de hongos en el suelo depende de la especie vegetal, ya que a través de las raíces exuda hormonas de señalización que activan los procesos de germinación de las esporas y esas señalizaciones suelen ser específicas para ciertos géneros o incluso ciertas especies. Por lo tanto, la selectividad de las plantas para con los microorganismos y las condiciones fisicoquímicas particulares de cada tipo de suelos, forman un “filtro” de especies de MA con las cuales poder hacer simbiosis (Lekberg y Waller 2016; Öpik y Peay 2016).

Se han realizado distintos estudios explorando la diversidad de especies de MA asociadas a la rizosfera de la soya (*Glycine max*). **García et al. 2018** realizaron un estudio en zonas de cultivo de la región central de Argentina e identificaron 8 especies de MA coincidiendo con esta investigación la identificación de la especie *G. albida*. **Souza et al. 2017** realizaron un estudio en la región de Brasilia en Brasil con el objetivo de determinar la diversidad de MA en soya tanto en campos con prácticas agrícolas tradicionales como de agricultura intensiva, estos autores encontraron un total de 58 especies, coincidiendo con esta investigación en la identificación de *F. mosseae*, *S. coremioides* y *R. intraradices*.

Kjøller y Rosendahl 2001 determinaron la diversidad de especies del género *Glomus* utilizando PCR anidado de muestras de suelos donde se cultivaba chícharo en Dinamarca. Identificaron un total de seis especies entre las que destacan *G. mosseae* (sinónimo de *F. mosseae*) y *G. intraradices* (sinónimo de *R. intraradices*), especies encontradas también en esta investigación.

Elhazzat et al. 2018 estudiaron la diversidad de AM en seis sitios productores de garbanzo en Marruecos, encontrando un total 12 especies, identificaron la especie *R. intraradices* y una especie perteneciente al género *Gigaspora*.

Abdel-Fattah 1997, realizó un estudio inoculando MA en cultivo de soya, la especie que utilizó fue *F. mosseae* con plantas de soya en suelo esterilizado, obteniendo valores altos en producción de biomasa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos, sin embargo, se difiere en cuanto al nivel de micorrización ya que este autor reporta niveles de micorrización por arriba del 30% siendo que en los resultados que se obtuvieron los aislamientos de *F. mosseae* no superaron el 25%.

Mahanta et al. 2018 realizaron un estudio durante dos años donde se midieron las propiedades físicas de la raíz, así como la capacidad de absorción de fósforo en cultivo de soya inoculado con MA en la India. Dentro de sus resultados reporta diferencias significativas en la biomasa de raíz en los cultivos inoculados con MA con respecto a los no inoculados, siendo las parcelas inoculadas las que presentaron una mayor biomasa, además de una mayor absorción de fósforo. Estos resultados concuerdan con lo aquí presentado.

Kucey y Paul 1983, realizaron un estudio en haba para determinar el número óptimo de esporas en el suelo como indicador de una comunidad sana de MA. Estos autores determinan un número mínimo de 4 esporas por 10 gramos de suelo, estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación donde el número mínimo de esporas por 10 gramos de suelo fue de 4 para todos los aislamientos de MA evaluados.

Dentro de los resultados obtenidos en los distintos parámetros tanto fisiológicos como de micorrización evaluados se determinó que los aislamientos M1_RI, M1_GA, M4_RI y M5_SC fueron los que presentaron resultados más consistentes, por lo cual estos aislamientos se utilizaron para llevarlos a pruebas de invernadero con el objetivo de compararlos con tratamientos tanto testigo como fertilizados.

Capítulo 2. Evaluación de la simbiosis de MA nativas con frijol var. Pinto americano y su influencia en el desarrollo fisiológico bajo condiciones de invernadero

Resumen

Con el fin de determinar la influencia de las MA en el desarrollo fisiológico del frijol se utilizaron cuatro aislamientos previamente seleccionados por su capacidad de micorrización mostrada en cámaras de crecimiento y se llevaron pruebas a nivel de invernadero.

El ensayo consistió en un testigo absoluto, un tratamiento fertilizado y cuatro tratamientos de MA. Se estandarizó el número de esporas a un mínimo de 20 esporas para cada tratamiento de MA. El diseño experimental fue completamente al azar.

El muestreo se realizó 45 días después de la siembra. Las variables que se midieron fueron: AP, LR, PSP, PSR, clorofila (unidades SPAD) y porcentaje de micorrización en raíz para los tratamientos a base de MA.

Se realizó un análisis de ANOVA y posteriormente una comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$), los resultados mostraron que hubo diferencias significativas en todas las variables analizadas excepto en la LR. En cuanto a la AP el tratamiento M4_RI presentó una media mayor al resto; en PSP y PSR los tratamientos a base de MA igualaron o superaron a los valores obtenidos por el tratamiento fertilizado; respecto a las unidades de clorofila no hubo diferencias significativas entre el tratamiento fertilizado y tres tratamientos de MA; en porcentaje de micorrización el tratamiento M4_RI se diferenció significativamente del resto de los tratamientos con MA.

En líneas generales el aislamiento M4_RI presentó un alto nivel de micorrización además de propiciar un mejor desarrollo fisiológico, por lo cual, fue la MA seleccionada para realizar el análisis de la simbiosis bajo diferentes tipos de estrés abiótico.

Introducción

Dentro de la asociación simbiótica el macrosimbionte (la planta) se beneficia al incrementar el área de exploración del suelo, gracias a la red de hifas del hongo micorrízico que tienen la capacidad de transportar agua y nutrientes de la interfase del suelo. Por otra parte, el microsimbionte (el hongo) usa el carbón que la planta le provee de sus funciones fisiológicas (**Yaseen et al. 2016**).

En el caso particular de la asociación entre MA y leguminosas, diversos estudios han reportado ventajas entre plantas micorrizas y no micorrizadas en suelos deficientes de fósforo lo cual se refleja en un incremento en la nodulación de raíces y fijación del nitrógeno, así como una mayor actividad nitrogenasa (**Chen et al. 2005; Duponnois 2005; Athar 2005**).

Se han utilizado MA en plantas de garbanzo encontrándose aumentos en PSP y PSR, así como, incrementos en el contenido de clorofila y contenido de nutrientes (**Fonseca et al. 1993; Bhattacharjee y Sharma 2012**). Otros aspectos para considerar que presentan las plantas de leguminosas estando en asociación con MA son: incremento de producción, mayor colonización en raíz, incremento en biomasa, incremento en la toma de nutrientes (**Murat et al. 2011; Jain et al. 2007; Rahman et al. 2008; Singh y Singh 2010**).

El objetivo en esta etapa de la investigación fue determinar que aislamientos de MA previamente seleccionados de los resultados obtenidos en las cámaras de crecimiento se asociaban de manera óptima con las plantas de frijol, determinando esto a través de la medición de parámetros de crecimiento fisiológico y de micorrización.

Material y métodos

Condiciones experimentales

El ensayo a nivel de invernadero se llevó a cabo de acuerdo con los tratamientos especificados en la Tabla 5. Se utilizaron 10 semillas de frijol var. Pinto americano para cada tratamiento. Para los tratamientos a base de micorrizas la inoculación se realizó directo en la semilla con 10g de suelo proveniente de los aislamientos previamente seleccionados.

Tabla 5. Características de los tratamientos utilizados para la prueba de efectividad de la micorrización a nivel de invernadero en plantas de frijol var. Pinto americano.

Tratamiento	Características
Fertilizado	Fertilización 40-60-00
Testigo	Testigo absoluto
M1_RI	<i>R. intraradices</i> proveniente de la zona de muestreo 1. 31 e/10g
M1_GA	<i>G. albida</i> de la zona de muestreo 1. 4.33 e/10g
M4_RI	<i>R. intraradices</i> de la zona de muestreo 4. 19.66 e/10g
M5_SC	<i>S. coremioides</i> de la zona de muestreo 5. 9 e/10g

Se utilizaron macetas de 1.5kg con mezcla de suelo:arena 2:3 previamente esterilizado a 120°C a 20 psi por 15 minutos, en total se utilizaron 10 macetas por tratamiento. El proceso de esterilización se realizó 3 veces. En cada maceta se sembró una semilla. En el caso de las macetas pertenecientes al tratamiento fertilizado, la fertilización se realizó directamente en el suelo antes de la siembra y de acuerdo con la dosis recomendada por **Martínez et al. 2008**.

El ensayo se puso entre los meses de abril y mayo, con una oscilación de temperaturas entre los 18 a 29°C. Las plantas se regaron 2 veces por semana con 150 ml de agua corriente. El ensayo se mantuvo en crecimiento durante 45 días.

El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones para cada tratamiento.

Muestreo y análisis de datos

El muestreo se realizó 45 días después de la siembra, los parámetros que se midieron fueron: AP, LR, PSP, PSR y clorofila (medida con el equipo SPAD 502 minolta).

Para medir la colonización, se tiñeron las raíces utilizando la metodología propuesta por **Phillips y Hayman, 1970**. Posteriormente se midió la micorrización en porcentaje utilizando el método de “presencia o ausencia de infección en el segmento total de la raíz” propuesto por **Hayman, 1970**.

Los datos se sometieron a análisis ANOVA de una vía y posteriormente a una comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico IBM SPSS ver. 20, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos y las variables analizadas.

Resultados

En el anexo 2 se pueden consultar las tablas ANOVA y las tablas de comparación de medias.

Para la variable AP, las plantas del tratamiento M4_RI presentaron una altura mayor (59.91cm), diferenciándose significativamente del resto ($P < 0.001$), seguido por el tratamiento fertilizado (50.12cm) que obtuvo mayores alturas que los restantes tres tratamientos a base de MA. El testigo obtuvo los valores más bajos (figura 10).

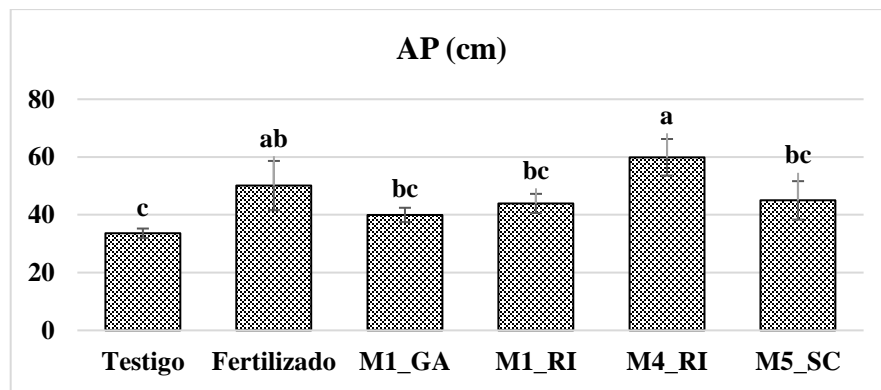


Figura 10. Diferencias en altura de la planta entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

Respecto a la LR no hubo diferencias significativas, $P=0.561$ (tabla 6).

Tabla 6. LR entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero, mediante el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas ($P=0.561$).

Tratamiento	LR
Testigo	24.47 ± 4.326 a
Fertilizado	27.73 ± 4.239 a
M1_GA	31.87 ± 1.784 a
M1_RI	26.15 ± 5.480 a
M4_RI	28.93 ± 6.953 a
M5_SC	30.88 ± 5.599 a

En PSP los tratamientos M1_GA, M4_RI, y M5_SC obtuvieron los valores medios más altos (0.81, 0.85, 0.78g respectivamente) y se diferenciaron significativamente del resto ($P < 0.001$), el tratamiento M1_RI no obtuvo diferencias significativas con el tratamiento fertilizado, el testigo absoluto obtuvo el valor más bajo y se diferenció significativamente del resto, $P < 0.001$ (figura 11).

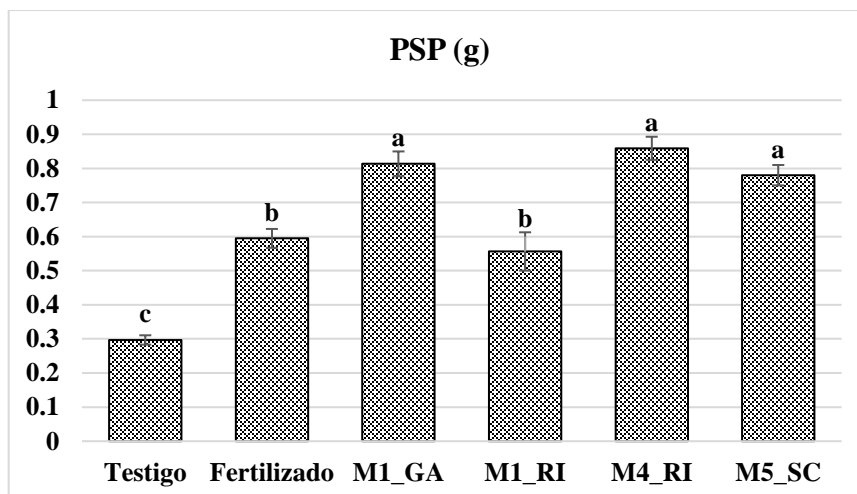


Figura 11. Valores medios obtenidos en peso seco de planta entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

En la figura 12 se observan los resultados obtenidos en PSR. El tratamiento M4_RI obtuvo el mayor valor medio (0.53g), diferenciándose significativamente del resto de tratamientos ($P < 0.001$). Cabe destacar que todos los tratamientos a base de MA se diferenciaron significativamente del tratamiento fertilizado y del testigo.

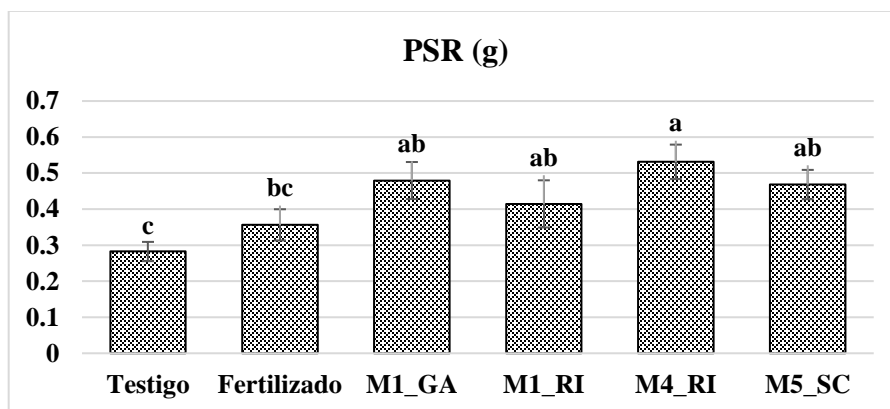


Figura 12. Valores medios obtenidos en peso seco de raíz entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

En la medición de clorofila no hubo diferencias significativas entre los tratamientos Fertilizado, M1_RI, M4_RI y M5_SC. El tratamiento M1_GA se diferenció significativamente del resto ($P = 0.001$) y el testigo obtuvo el valor medio más bajo (figura 13).

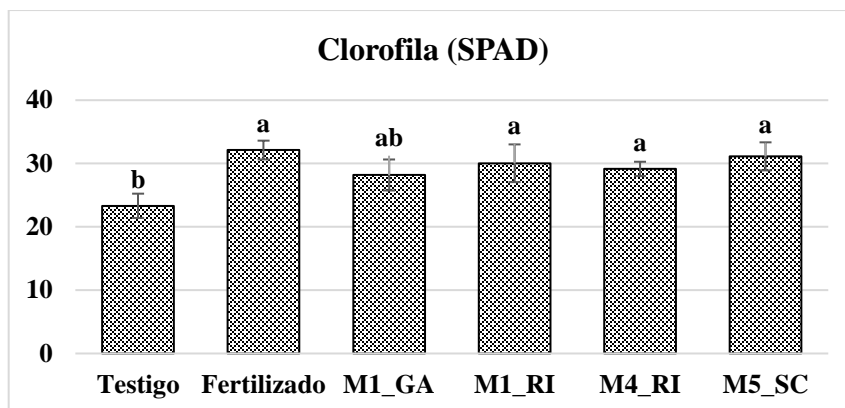


Figura 13. Valores medios obtenidos en clorofila (unidades SPAD) entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

Como se observa en la figura 14, el tratamiento M4_RI de *R. intraradices* obtuvo un mayor porcentaje de micorrización (63.4%) y se diferenció significativamente del resto de los tratamientos con MA ($P < 0.001$).

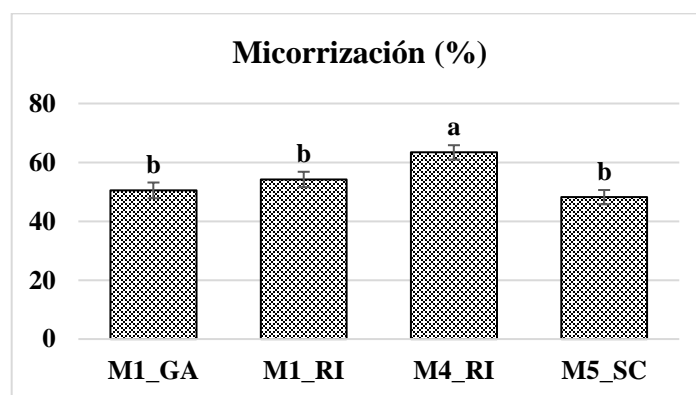


Figura 14. Valores medios obtenidos en porcentaje de micorrización entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

Discusión

En el microbiota presente en el suelo se encuentran una gran diversidad de especies de bacterias tanto noduladoras y/o solubilizadoras de fósforo o nitrógeno, además de hongos solubilizadores y MA. Si bien estas interacciones con las leguminosas son en beneficio y apoyan el crecimiento de las plantas en condiciones de escasas de nutrientes y agua, se ha reportado la preferencia de las especies de leguminosas con MA principalmente por la facilidad que le confieren estas a la absorción de fósforo, componente esencial para las leguminosas (**Sprent y James 2007; Mohammadi et al. 2011**). Lo anterior nos puede dar una explicación de porque las MA utilizadas en este trabajo tienen un alto porcentaje de colonización y de beneficios fisiológicos para las plantas de frijol var. Pinto Americano en comparación con el tratamiento testigo y fertilizado.

En general los parámetros de desarrollo fisiológico analizados en este trabajo fueron influenciados positivamente por la inoculación con MA, exceptuando la longitud de raíz donde no se encontraron diferencias significativas, estos resultados concuerdan con lo expuesto por **Mortimer et al. 2012** quienes inocularon árboles de *Acacia cyclops* con MA obteniendo incrementos en biomasa, pero no encontraron diferencias en longitud de raíz. **Aguirre et al. 2009** mencionan que el incremento de longitud o biomasa de raíz no siempre se ve reflejado en plantas inoculadas con MA debido a la capacidad de absorción de las hifas del hongo y que de cierta manera sustituyen la función propia de las raíces, por lo cual las plantas no desarrollan raíces muy largas para poder absorber nutrientes.

Otros autores han relacionado el uso de MA con un mayor número de nódulos, contenido de fósforo, biomasa y rendimiento de grano que, en sus contrapartes no inoculados, esto debido principalmente a la capacidad de absorción de las hifas de iones de fósforo y nitrógeno que pasan a las plantas (**Alloush et al. 2000; Pellegrino y Bedini 2014**).

Como se observa en los resultados existe una inconsistencia entre el porcentaje de micorrización de cada MA con los distintos parámetros fisiológicos evaluados, es decir, que altos porcentajes de micorrización no siempre se traduce en un mayor desarrollo fisiológico, por lo tanto, es importante ser medido al momento de trabajar con MA ya que no siempre son una opción para utilizarse como biofertilizante. Este tipo de inconsistencias han sido anteriormente reportadas en estudios con frijol común. **Ibijbijen**

et al. 1996 utilizó cuatro especies diferentes de MA (*Glomus clarum*, *G. etunicatum*, *G. manhiotis* y *Gigaspora margarita*), con tres variedades diferentes de frijol común (Carioca, Negro Argel y Rio Tibagi), estos autores reportan que de manera general la media de biomasa se incrementó con el uso de MA, pero no encontraron una relación con otros valores medidos como porcentaje de micorrización y aumento de captación de fósforo y nitrógeno.

Los porcentajes de micorrización aquí obtenidos están por encima del 48% para el tratamiento en el que hubo menos colonización (M5_SC) hasta 63.4% para el tratamiento más colonizado (M4_RI); **Aguirre et al. 2009** inocularon plantas de frijol y maíz con un ecotipo de *R. intraradices* obteniendo valores superiores al 40% de colonización, pero sin llegar a valores de colonización como los reportados aquí de 63.4%, aún y cuando se utilizó la misma especie de MA. Lo anterior nos indica la importancia de los ecotipos y la variabilidad que se puede presentar al trabajar con dos organismos vivos, de diferente reino biológico y que además tienen que formar una asociación ecológica.

En líneas generales el aislamiento M4_RI presentó un alto nivel de micorrización además de propiciar un mejor desarrollo fisiológico, por lo cual, fue la MA seleccionada para realizar el análisis de la simbiosis bajo diferentes tipos de estrés abiótico.

Capítulo 3. Determinación de la influencia de la micorrización en el desarrollo fisiológico de plantas de frijol var. Pinto americano bajo condiciones de estrés hídrico.

5.3.1 Resumen

La escasez de agua es uno de los factores abióticos más limitantes para la producción de cultivos en todo el mundo. Con el cambio climático cada vez son más largos los periodos de sequía y las lluvias más escasas. Lo anterior provoca que se vea comprometida más del 40% de la superficie cultivable del mundo.

Ante esta situación esfuerzos se han enfocado al uso de diferentes herramientas para mitigar los efectos negativos de la escasez de agua. En años recientes ha vuelto a tomar importancia el uso de MA debido a que se conoce la capacidad de estos hongos de proveer de nutrientes y agua a la planta que coloniza. Sin embargo, no se conoce del todo bien cómo funciona esta interacción biológica y suele haber resultados diferentes debido al poco conocimiento sobre que especies de MA son mayormente elegidas por las distintas especies de plantas que pueden colonizar.

En este trabajo se utilizó un aislamiento de *R. intraradices* aislado de la rizosfera del frijol y con capacidad probada de colonización a plantas de *P. vulgaris*. El diseño fue factorial 2x3 al azar, evaluándose el PSP, PSR y variables de micorrización tanto en plantas inoculadas como no inoculadas que crecieron en diferentes volúmenes de riego (50, 25 y 12.5 ml de agua). Los datos obtenidos se sometieron a un ANOVA y a una comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.005$). En líneas generales se encontró que las plantas micorrizadas producen una mayor biomasa que sus contrapartes no micorrizadas en cualquiera de los tres volúmenes de riego. Además, se constató que un nivel moderado de estrés hídrico promueve una mayor micorrización lo cual supone una mayor adaptación de la planta a condiciones de sequía. Se discuten las posibles interacciones tanto morfológicas como bioquímicas que suceden en las micorrizas expuestas a condiciones de escasez de agua.

Introducción

La escasez de agua es uno de los factores abióticos que tienen más efectos negativos en la producción de alimentos. Más del 40% de la tierra cultivable en el mundo está sujeta a cierta escasez de agua (**Singh et al. 2012**).

Durante la sequía las plantas cambian su metabolismo con el fin de mantener un alto potencial hídrico en sus tejidos. Este tipo de adaptaciones fisiológicas le confieren a la planta una resistencia a la sequía. Sin embargo, otros factores como la cantidad de días sin agua o el estado fenológico en el cual se encuentra una planta puede implicar limitaciones en esta resistencia a la sequía (**Blum 2005; Gong et al. 2013**).

Con el fin de aminorar los efectos negativos en la agricultura por los cada vez más prolongados periodos de sequía varios esfuerzos se han enfocado a estudiar el papel de los microorganismos del suelo que directa o indirectamente benefician a las plantas además del beneficio que estos aportan en la retención de humedad en el suelo (**Power y Mills 1995**). Dentro de los diferentes microorganismos que componen la rizosfera se ha puesto particular interés en los hongos MA de los cuales se tiene conocimiento que las hifas de este hongo funcionan como extensiones de las raíces de las plantas ya que tienen la capacidad de absorber diversos nutrientes y agua presentes en el suelo (**Auge 2004; Subramanian et al. 2006; Smith y Read 2008**), además bajo condiciones de estrés hídrico las MA capturan más cobre y fósforo (**Al-Karaki y Clark 1998**). Dentro de los parámetros fisiológicos que se ven influenciados por la micorriza en condiciones de estrés hídrico se encuentran: incremento de la conductancia estomatal mediada por ácido abscísico, aumento del potencial del agua en hoja, aumento de pigmentos fotosintéticos, incremento de la fotosíntesis, aumento de aquaporinas, e incremento de nitrato reductasa y glutaminsintetasa (**Sharma et al. 2015**).

Las particulares características de esta asociación ecológica mediada por hongos han detonado líneas de investigación que tienen por objetivo efficientizar el uso de fertilizantes y agua, retener la humedad en suelos, así como mejorar la estructura de este. Sin embargo, se presentan varias limitantes al uso comercial de estos hongos, destacando la falta de conocimiento sobre que especies de plantas son más susceptibles a la micorrización con

que especies de hongos, como se media esta interacción y cuáles son los beneficios reales de emplear esta tecnología (**Gianinazzi y Vosatka 2004**).

Por lo anterior en este capítulo se tiene por objetivo validar el efecto de *R. intraradices* hongo nativo aislado de la rizosfera de *P. vulgaris* con capacidad de alta colonización hacia esta planta y evaluar mediante un ensayo en invernadero la resistencia de esta simbiosis a estrés hídrico, tomando en cuenta variables de desarrollo de las plantas (biomasa) y variables de micorrización.

Material y métodos

Bioensayos en invernadero

El experimento de estrés hídrico se realizó con los tratamientos especificados en la tabla 7.

La mezcla de sustrato utilizado fue tierra:arena 2:3 esterilizada. Se utilizaron semillas de frijol var. Pinto americano previamente desinfectadas, que se dejaron crecer en charolas de germinación. Las plántulas se retiraron al quinto día. De manera visual se seleccionaron 30 plantas para pasarlas a macetas, la selección se realizó con el fin de descartar aquellas semillas que no germinaron o plántulas que presentan un desarrollo fisiológico menor o por encima de la media.

Se utilizaron 5 macetas por tratamiento cada maceta con 150 g de sustrato cada una. Para los tratamientos inoculados se utilizó 1 gramo de inóculo por maceta, cada gramo conteniendo 8 esporas de M4_RI. En cada maceta se sembró una plántula, dando un total de 30 macetas. La saturación del suelo se determinó a 50ml de agua.

El diseño experimental consistió en un sistema factorial completamente al azar 2x3. El primer factor comprendió suelo inoculado y no inoculado con M4_RI, el segundo factor consistió en la saturación del sustrato, 100, 50 y 25%.

Tabla 7. Tratamientos utilizados y especificaciones de cada uno para la prueba de efectividad de la micorrización bajo estrés hídrico a nivel de invernadero en plantas de frijol var. Pinto americano.

Tratamiento	Características
Ctrl NI	Control, no inoculado, saturado 100%, 50 ml de agua
Ctrl I	Control, inoculado, saturado 100%, 50 ml de agua
H50 NI	No inoculado, saturado 50%, 25 ml de agua
H50 I	Inoculado, saturado 50%, 25 ml de agua
H25 NI	No inoculado, saturado 25%, 12.5 ml de agua
H25 I	Inoculado, saturado 25%, 12.5 ml de agua

El experimento se realizó en el mes de marzo y abril, con una oscilación de temperaturas entre los 17 a 28°C. Las plantas se regaron cada tercer día con el volumen de agua

correspondiente para cada tratamiento. El ensayo se mantuvo en crecimiento durante 35 días.

Muestreo y análisis de datos

Las variables que se midieron fueron: PSP, PSR, porcentaje de micorrización, A% y M%.

Para determinar la intensidad de la micorrización y la abundancia de arbusculos se utilizó la metodología propuesta por **Trouvelot et al. 1986**, los resultados finales se calcularon utilizando el programa informático mycoCalc (ver. 1.0).

Para medir la colonización, se tiñeron las raíces utilizando la metodología propuesta por **Phillips y Hayman, 1970**. Posteriormente se midió la micorrización en porcentaje utilizando el método de “presencia o ausencia de infección en el segmento total de la raíz” propuesto por **Hayman, 1970**.

A los datos recabados se realizó prueba de ANOVA de una vía y posteriormente comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico IBM SPSS ver. 20, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos y las variables analizadas.

Resultados

En el anexo 3 se pueden consultar las tablas ANOVA y las tablas de comparación de medias.

En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico entre los distintos tratamientos en relación con el PSP. Con una saturación del 100% el tratamiento inoculado se diferenció significativamente del resto de los tratamientos ($P < 0.001$) obteniendo el valor mayor de media (0.82 g). Cabe destacar que el tratamiento control no inoculado no se diferenció significativamente del tratamiento H50 inoculado. El valor de media más bajo se obtuvo en el tratamiento H25 no inoculado (0.36 g).

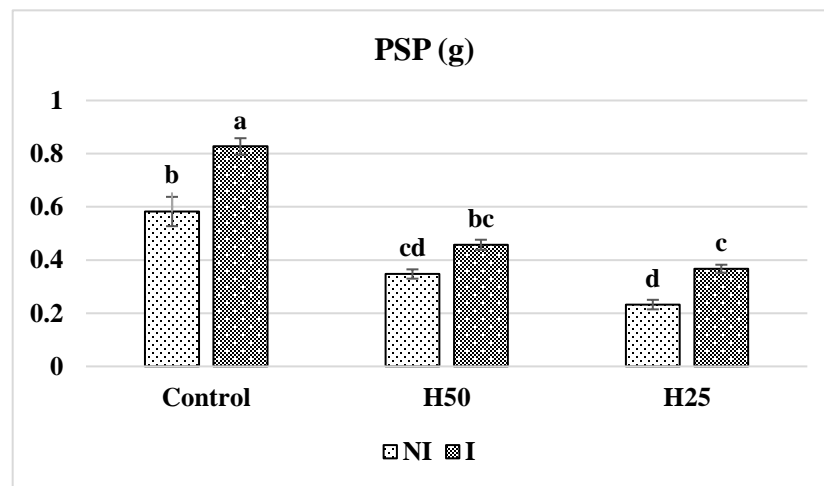


Figura 15. Valores medios obtenidos en peso seco de planta entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

En la figura 16 se muestran las diferencias en PSR entre los diferentes tratamientos. El control no inoculado (saturación 100%) obtuvo el valor medio más alto (0.52 g) y se diferenció estadísticamente del resto de los tratamientos ($P < 0.001$). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos inoculados control (0.34 g) y H50 (0.35 g), pero si se diferenciaron estos tratamientos del tratamiento H50 no inoculado. El tratamiento H25 no inoculado obtuvo el valor más bajo con una media de 0.15 g.

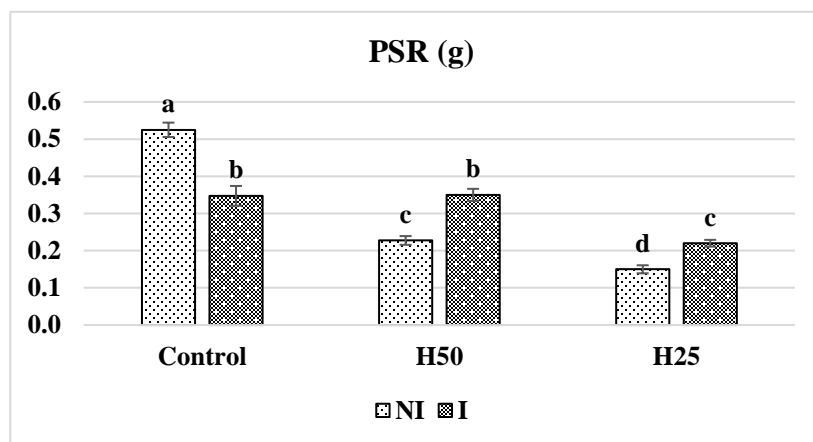


Figura 16. Valores medios obtenidos en peso seco de raíz entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

Hubo diferencias significativas entre el porcentaje de micorrización entre los tratamientos inoculados a diferentes saturaciones de campo ($P < 0.001$). El mayor valor medio de micorrización se obtuvo en el tratamiento H50 con 34.45% (figura 17).

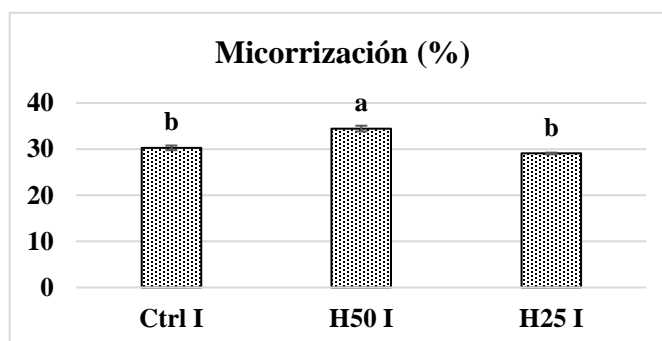


Figura 17. Valores medios obtenidos en porcentaje de micorrización entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

En la tabla 8 se observan los resultados de A%, el tratamiento inoculado H50 se diferenció significativamente del resto con una media de 9.54% ($P < 0.001$).

Tabla 8. Valores medios obtenidos en abundancia de arbuscúlos entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

Tratamiento	A%
Control I	4.12 ± 0.354 b
H50 I	9.54 ± 0.424 a
H25 I	1.62 ± 0.261 c

En relación con la intensidad de la micorrización el tratamiento inoculado H50 obtuvo una media mayor al resto de los tratamientos diferenciándose significativamente, $P < 0.001$, (tabla 9).

Tabla 9. Valores medios obtenidos en intensidad de micorrización entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero.

Tratamiento	M%
Control I	7.40 \pm 0.273 b
H50 I	10.75 \pm 0.240 a
H25 I	5.02 \pm 0.353 c

Discusión

El análisis estadístico muestra la relación positiva entre plantas de frijol var. Pinto Americano inoculadas con la MA *R. intraradices*. Respecto al PSP los tratamientos con inóculo de MA obtuvieron medias superiores a sus contrapartes no inoculadas, independiente de la cantidad de agua suministrada. Resultados similares se han reportado en plantas de tomate inoculadas con *R. intraradices* donde se ha observado una mejora en el estatus nutricional, incremento en el peso de la planta, además de flores y frutos con mayor cantidad de ácido ascórbico en suelos con escasa humedad (**Subramanian et al. 2006**).

En el tratamiento control se observa un mayor PSR en las plantas no inoculadas que en sus contrapartes inoculadas, sin embargo, el PSP de las plantas inoculadas es mayor para ambos casos en donde los tratamientos tenían menor saturación de agua (saturaciones de 50 y 25%), estos resultados concuerdan con investigaciones realizadas en diferentes cultivos de importancia económica donde se destaca la resistencia de la micorriza a condiciones de estrés hídrico (**Mathimaran et al. 2017**).

En leguminosas existen pocas referencias de experimentos realizados donde se evaluó la resistencia de estas plantas micorrizadas a situaciones de estrés hídrico. **Ballesteros – Almanza et al. 2010** reportan que en plantas de frijol común (*P. vulgaris*) micorrizadas al ser puestas en condiciones de escases de agua se aumenta la cantidad de hifa intraradical y extraradical, además de un mayor número y desarrollo de arbusculos, resultados que concuerdan con lo obtenido en este trabajo donde se observa que en condiciones de saturación de 50% hay una mayor abundancia de arbusculos además de una mayor intensidad de micorrización. Trabajos realizados en garbanzo (*Cicer arietinum*) inoculado con *R. intraradices* bajo condiciones de sequía han reportado un incremento en porcentajes de colonización micorrízica y un desarrollo fisiológico eficiente, además de un mayor potencial hídrico de la hoja y una protección al estrés oxidativo conferido por la micorriza (**Porcel y Ruiz – Lozano. 2004**).

La especie *R. intraradices* suele tener un mejor rendimiento en condiciones de escases de agua que otras especies de MA, estudios realizados con plantas de la familia Rosaceae y variedades de maíz y lechuga han determinado la eficacia de esta especie de MA sobre

otras como *Glomus desertícola*, *Funneliformis mosseae* y *Gigaspora* sp. (**Ruiz – Lozano et al. 1995; Marulanda et al. 2003; Zhu et al. 2010**).

Diversas investigaciones se han realizado con el fin de determinar la manera en la cual una planta micorrizada puede subsistir y desarrollarse adecuadamente ante una situación de escasez de agua.

Auge 2004 concluye que en determinadas condiciones de estrés hídrico la micorriza ayuda a las plantas a mejorar la capacidad de transportar agua mediante sus hifas externas. Además de un mayor acarreo de agua se ha determinado que también se mejora el acarreo de cobre (Cu) y fósforo (P), esto se ha reportado en cultivos como trigo, distintos cítricos y maíz (**Al-Karaki y Clark. 1998; Al-Karaki et al. 2004; Qiangsheng y Renxue 2006; Wu et al. 2006**).

Otras investigaciones que tratan de explicar esta tolerancia conferida por la MA en plantas se han enfocado en la síntesis de acuaporinas, proteínas cuya función es regular el balance hídrico dentro de la célula vegetal (**Li et al. 2012**). Estudios realizados en plantas de maíz han demostrado que las plantas micorrizadas suelen tener una mayor expresión de genes que codifican acuaporinas, tal es el caso de los genes p5cs, además de la familia de genes nced que codifican la enzima para la biosíntesis de ácido abscísico (**Porcel et al. 2006; Aroca et al. 2008**).

Capítulo 4. Determinación de la influencia de la micorrización en el desarrollo fisiológico de plantas de frijol var. Pinto americano en suelos contaminados artificialmente con plomo.

Resumen

La contaminación del suelo por metales pesados se ha vuelto un problema ambiental y es que, debido principalmente a la actividad humana, es cada vez más frecuente que metales como plomo, cadmio, arsénico y zinc se encuentren en suelos en cantidades que limitan el aprovechamiento de áreas con potencial de explotación agrícola.

Ante esta situación los microorganismos presentes en el suelo han tomado importancia por su capacidad de procesar los metales pesados y reducir la toxicidad que ocasionan a las plantas. Dentro de estos microorganismos destacan las MA debido a que se conoce la capacidad de estos hongos de proporcionar agua y sólo los nutrientes que necesita la planta que coloniza, así como la capacidad que tienen para inmovilizar iones metálicos. Sin embargo, no se conoce bien si la asociación *P. vulgaris* – *R. intraradices* da una ventaja al establecimiento de plantas de frijol en suelos contaminados con metales pesados.

En este trabajo se utilizó un aislamiento de *R. intraradices* aislado de la rizosfera del frijol y con capacidad probada de colonización a plantas de *P. vulgaris* y se evaluó a nivel de invernadero mediante un diseño factorial 2x3 al azar, evaluándose el PSP, PSR y variables de micorrización tanto en plantas inoculadas como no inoculadas que crecieron en sustratos con diferentes concentraciones de plomo (0, 100 y 200 ppm). Se realizó un ANOVA y posteriormente comparación de medias Tukey. En concentraciones de plomo 200 ppm se incrementó el PSP en el tratamiento inoculado, sin embargo, estos incrementos no se vieron reflejados en el PSR. Las M% se incrementaron en los tratamientos en los cuales se utilizó plomo, los cuales se diferenciaron significativamente del control. La A% fue mayor en el tratamiento de plomo 200 ppm lo cual indica la importancia del establecimiento de arbuscúlos y su efecto en el establecimiento de *P. vulgaris* en suelos contaminados con este metal pesado. Se discuten las posibles interacciones tanto morfológicas como bioquímicas que suceden en la simbiosis en presencia de metales pesados.

Introducción

La contaminación a nivel mundial con metales tóxicos debido a las actividades humanas supone un serio problema ambiental y de salud. El suelo es el depósito de metales como cromo, plomo, cadmio, arsénico y cobre, entre otros, siendo posiblemente el plomo el metal más abundante y distribuido en el suelo (**Tiwari y Bauddh 2020; Mireles et al. 2012; Sharma y Dubey 2005**).

Altos niveles de plomo en el suelo tienen efectos negativos en el desarrollo de plantas, principalmente mermando la capacidad fotosintética, la captura de nutrientes y el balance hídrico (**Verma y Dubey 2003; Bauddh et al. 2016; Sharma y Dubey 2005**).

Si bien se conoce ampliamente como la relación MA-Planta puede mejorar el crecimiento de la planta o generar una mayor cantidad de raíz, son pocos los estudios de este tipo de interacciones en condiciones de estrés abiótico, más escasos son los estudios enfocados a evaluar esta simbiosis en suelos contaminados con plomo (**Kawai y Tokeshi 2007**).

Se conoce que cantidades excesivas de plomo no nada más afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas, sino que también, merman la diversidad y actividad microbiana del suelo, lo cual repercute en bajas tasas de colonización y de densidad de esporas de MA, por otra parte, el plomo afecta las redes de hifas extra radicales (**Yang et al. 2016; Yang et al. 2015**).

Eom et al. 2000 menciona que la tolerancia de las plantas micorrizadas al plomo varía significativamente entre especies de plantas bajo las mismas condiciones de estrés, aunado a la variación que puede presentarse en cuanto a las MA que colonizan estas plantas y la intensidad de la micorrización, haciendo este tipo de investigaciones un reto por la cantidad de variables que juegan en contra del establecimiento de la simbiosis.

Se conoce que las hifas pueden inmovilizar iones de plomo o permitir su almacenamiento en las vesículas de la MA (**Giovannini et al. 2002; González-Chavez et al. 2002**). La glomalina es una glicoproteína que forma complejos con el plomo, además tiene otros efectos como una mayor agregación del suelo y contribuye al metabolismo del carbón, lo cual beneficia al crecimiento de las plantas (**Rillig et al. 2001; Hildebrandt et al. 2007**).

Los beneficios que esta simbiosis representa para el posible establecimiento de cultivos en suelos contaminados con plomo han abierto camino a distintas líneas de investigación que permitirán determinar la asociación cultivo-MA idónea para ser utilizadas en las diferentes regiones agrícolas contaminadas con este metal pesado (**Tiwari et al. 2020**).

En el experimento concerniente a este capítulo se evaluó mediante ensayos de invernadero la resistencia de la simbiosis *R. intraradices* – *P. vulgaris* a condiciones de estrés por plomo presente en el suelo, tomando en cuenta variables de crecimiento de las plantas y variables de micorrización.

Material y métodos

Bioensayos en invernadero

El experimento con suelo contaminado con plomo se realizó con los tratamientos especificados en la Tabla 10.

La mezcla de sustrato utilizado fue tierra:arena 2:3 esterilizada. Para la contaminación del sustrato se utilizó nitrato de plomo, $Pb(NO_3)_2$ tomando en cuenta el peso molecular del compuesto y el peso molecular de arsénico. Para la concentración de 100 ppm de plomo se utilizaron 1.27 g de nitrato de plomo diluidos en 300 ml de agua y rociados sobre 8 kg de sustrato; para la concentración de 200 ppm se utilizaron 2.55 g en 8 kg de sustrato. Una vez contaminado el sustrato se dejó secar a temperatura ambiente, ya que estuviera completamente seco se guardó en bolsas plásticas y se refrigeró hasta su utilización.

Se utilizaron semillas de frijol var. Pinto americano previamente desinfectadas, que se dejaron crecer en charolas de germinación. Las plántulas se retiraron al quinto día. De manera visual se seleccionaron 30 plantas para pasarlas a macetas, la selección se realizó con el fin de descartar aquellas semillas que no germinaron o plántulas que presentan un desarrollo fisiológico menor o por encima de la media.

Se utilizaron 5 macetas por tratamiento cada maceta con 150 g de sustrato cada una. Para los tratamientos inoculados se utilizó 1 gramo de inóculo por maceta, cada gramo conteniendo 8 esporas de M4_RI. En cada maceta se sembró una plántula, dando un total de 30 macetas

El diseño experimental consistió en un sistema factorial completamente al azar 2x3. El primer factor comprendió suelo inoculado y no inoculado con M4_RI, el segundo factor consistió en la cantidad de plomo, 0, 100 y 200 ppm.

Tabla 10. Tratamientos utilizados y especificaciones de cada uno para la prueba de efectividad de la micorrización bajo estrés por suelo contaminado con plomo a nivel de invernadero en plantas de frijol var. Pinto americano.

Tratamiento	Características
Ctrl NI	Control, no inoculado, sustrato sin contaminar
Ctrl I	Control, inoculado, sustrato sin contaminar
Pb100 NI	No inoculado, sustrato con plomo a 100 ppm
Pb100 I	Inoculado, sustrato con plomo a 100 ppm
Pb200 NI	No inoculado, sustrato con plomo a 200 ppm
Pb200 I	Inoculado, sustrato con plomo a 200 ppm

El experimento se realizó en el mes de marzo y abril, con una oscilación de temperaturas entre los 17 a 28°C. Las plantas se regaron cada tercer día con 80 ml de agua. El ensayo se mantuvo en crecimiento durante 35 días.

Muestreo y análisis de datos

Las variables que se midieron fueron: PSP, PSR, porcentaje de micorrización, M% y A%.

Para medir la colonización, se tiñeron las raíces utilizando la metodología propuesta por **Phillips y Hayman, 1970**. Posteriormente se midió la micorrización en porcentaje utilizando el método de “presencia o ausencia de infección en el segmento total de la raíz” propuesto por **Hayman, 1970**.

Para determinar la intensidad de la micorrización y la abundancia de arbusculos se utilizó la metodología propuesta por **Trouvelot et al. 1986**, los resultados finales se calcularon utilizando el programa informático mycocalc (ver. 1.0).

A los datos recabados se realizó prueba de ANOVA de una vía y posteriormente comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico IBM SPSS ver. 20, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos y las variables analizadas.

Resultados

En el anexo 4 se pueden consultar las tablas ANOVA y las tablas de comparación de medias.

En la figura 18 se muestran las diferencias entre los distintos tratamientos en relación con el PSP. Con una concentración de plomo a 200 ppm el tratamiento inoculado se diferenció significativamente del resto de los tratamientos ($P < 0.001$) obteniendo el mayor valor promedio (0.95 g). Se agruparon en el mismo subconjunto el control inoculado y los tratamientos de plomo 100, así como, el tratamiento no inoculado de plomo 200. Cabe destacar que el tratamiento control no inoculado obtuvo los valores más bajos de biomasa de parte aérea (0.417 g).

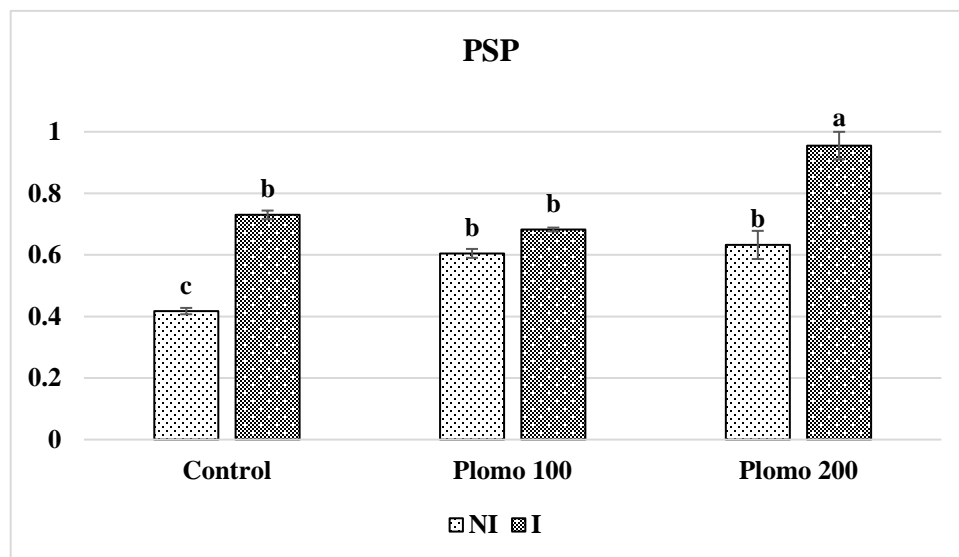


Figura 18. Valores medios obtenidos en peso seco de planta entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.

En la figura 19 se muestran las diferencias en PSR entre los diferentes tratamientos. No se encontraron diferencias entre el tratamiento no inoculado con concentración de plomo 200 ppm (0.67 g) y los tratamientos de plomo 100 (0.61 g no inoculado y 0.65 g inoculado). Los tratamientos control (0.39 g no inoculado y 0.37 g inoculado) y el tratamiento plomo 200 inoculado (0.38 g) no presentaron diferencia en sus medias.

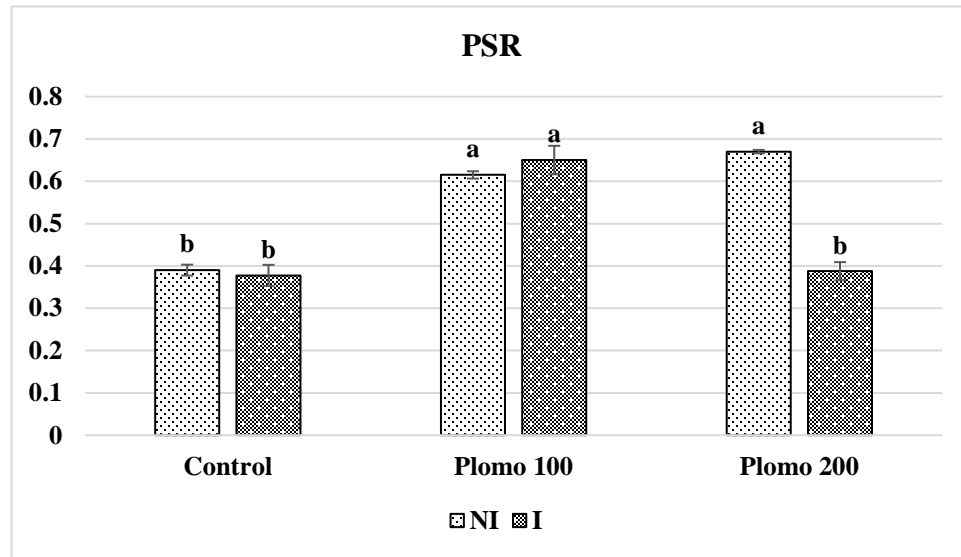


Figura 19. Valores medios obtenidos en peso seco de raíz entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.

No hubo diferencias significativas entre el porcentaje de micorrización entre los tratamientos inoculados a diferentes concentraciones de plomo ($P=0.968$), esto se observa mejor en la tabla 11.

Tabla 11. Valores medios obtenidos en porcentaje de micorrización entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.

Tratamiento	Micorrización
Control	37.09 ± 1.165 a
Plomo 100	37.26 ± 2.186 a
Plomo 200	37.69 ± 1.185 a

En la figura 20 se observan los resultados obtenidos en abundancia de arbusculos. Se encontraron diferencias significativas ($P<0.001$), el tratamiento plomo 200 obtuvo el valor medio más alto, 12.89%. El control obtuvo el valor medio más bajo con 1.00%.

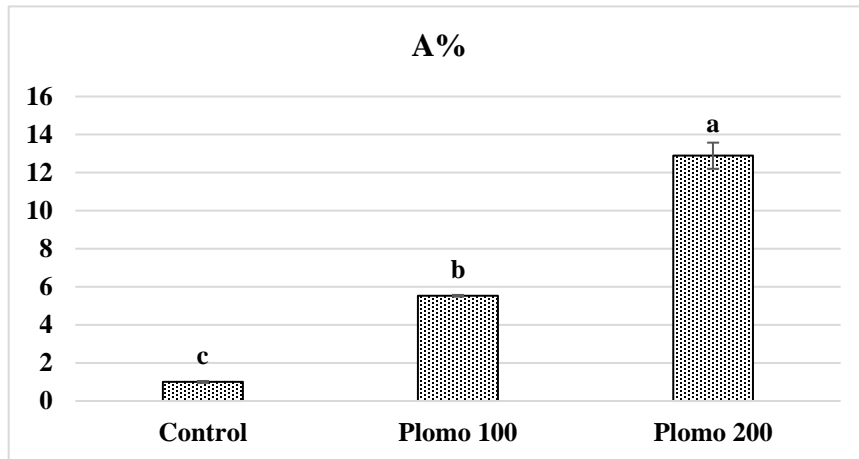


Figura 20. Valores medios obtenidos en abundancia de arbusculos entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.

Respecto a la intensidad de micorrización (figura 21) los tratamientos plomo 100 (14.6%) y plomo 200 (15.86%) se diferenciaron significativamente ($P < 0.001$) del control (3.84%).

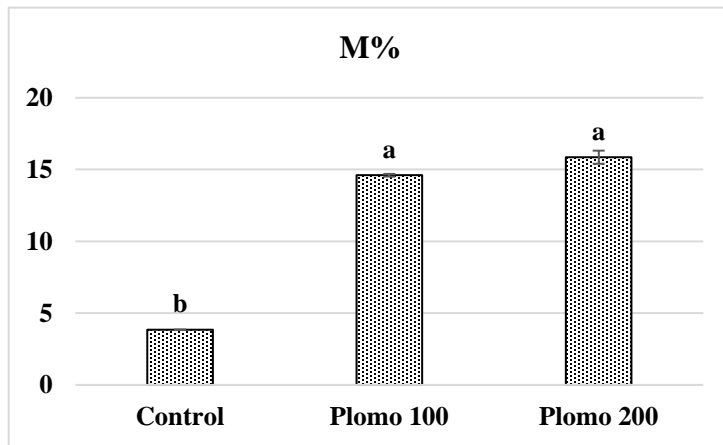


Figura 21. Valores medios obtenidos en intensidad de micorrización entre los diferentes tratamientos en el experimento de plomo a nivel de invernadero.

Discusión

El PSP no se vio significativamente afectado por la concentración de plomo, tampoco se observaron síntomas de toxicidad en las plantas, contrariamente a lo que se esperaba ya que es bien conocido que los metales pesados en el suelo influyen negativamente en el desarrollo de las plantas al bloquear la absorción de iones a nivel celular (**Dueck et al. 1986; Godbold y Kettner 1991**). Cabe destacar que el mayor PSP se encontró en el tratamiento inoculado de plomo 200, resultados similares se han obtenido en plantas de soya (*Glycine max*) en concentraciones de plomo 150, 300 y 600 ppm utilizando la especie de micorriza *Glomus macrocarpum* (**Andrade et al. 2004**), así como, en experimentos donde se ha utilizado la planta *Robina pseudoacacia* (**Yang et al. 2016**). Cabe señalar que el peso fue incrementando conforme se incrementaba la concentración de plomo, esta tendencia se ha observado también en plantas de maíz micorrizadas con *Funneliformis mosseae* creciendo en suelos contaminados con plomo y cadmio (**Singh et al. 2019**) y en plantas micorrizadas de *Sorghum bicolor* y *Arachis hipogea* creciendo en suelos contaminados con metales pesados (**González-Guerrero et al. 2016**). El tratamiento que obtuvo el menor PSP fue el tratamiento control no inoculado, esto puede deberse a que el compuesto químico que se utilizó para contaminar el suelo fue nitrato de plomo, y este compuesto al contener nitrógeno (nutriente esencial para el crecimiento de plantas) influyo en un mayor crecimiento de las plantas que crecían en sustrato contaminado, sin embargo, el nitrato de plomo suele ser el compuesto químico comúnmente utilizado en este tipo de investigaciones, donde el sustrato se contamina artificialmente (**Andrade et al. 2004; Setyaningshi et al. 2017**).

Al igual que con el PSP, el PSR se vio incrementado conforme se aumentó la concentración de plomo, excepto en el tratamiento plomo 200 inoculado donde el valor medio no se diferenció de los controles, contrario a lo que reporta **de Fatima et al. 2018** en sorgo micorrizado con una mezcla de MA. **Andrade et al. 2004**, mencionan que PSR en plantas de soya se ve afectado en concentraciones de metales pesados cuando estas están cerca del límite máximo tolerable de las plantas, en estos casos estos autores asumen que la planta al estar en un ambiente de mayor toxicidad retiene el crecimiento de la raíz y hace uso del microbiota disponible en el suelo para subsistir.

El exceso de plomo no afectó el porcentaje de micorrización el cual se mantuvo constante independientemente de la concentración de plomo, coincidiendo con **Yang et al. 2016** y **Khade y Adholeya 2009**, sin embargo, en suelos contaminados con zinc se ha reportado lo contrario (**Shetty et al. 1994**). A pesar de que el porcentaje de micorrización fue igual en los tres tratamientos inoculados no sucedió así con la A% y con M%, donde a diferencia del porcentaje de micorrización los valores obtenidos de estas variables si se vieron afectados positivamente conforme se aumentó la concentración de plomo, esta tendencia se ha observado en suelos contaminados con hidrocarburos y plomo (**Lenoir et al. 2016; Yang et al. 2016**), pero difiere de lo reportado por **Madejon et al. 2010** quienes obtienen intensidades de colonización inferiores en pastos australianos en simbiosis con *Glomus* sp. en suelos multicontaminados.

Relacionando el porcentaje de micorrización, A% y M% con los valores obtenidos de PSP y PSR del tratamiento inoculado plomo 200 se puede inferir que la simbiosis *P. vulgaris-R. intraradices* es eficiente en estas condiciones de estrés, donde *R. intraradices* es un apoyo importante en la captura de nutrientes para el mantenimiento de las plantas de *P. vulgaris* a nivel de invernadero, **Bago et al. 2000**, sugieren que entre el 4 y el 20% de los productos totales fotosintéticos son suministrados por la MA, a su vez, se ha demostrado que la glomalina funciona como un estabilizador de plomo y que las vesículas tienen la capacidad de almacenar metales pesados, permitiendo a las plantas micorrizadas subsistir en suelos contaminados con este metal pesado (**Vodnik et al. 2008; Ghöre y Pazkowski 2006**).

Capítulo 5. Determinación de la influencia en el desarrollo fisiológico de plantas micorrizadas de frijol var. Pinto Americano en suelos contaminados artificialmente con arsénico.

Resumen

El arsénico se ha incrementado en suelos de uso agrícola debido a la actividad humana y puede tener efectos tóxicos dependiendo de las concentraciones que estén presentes en el suelo.

Aun así, en la naturaleza las plantas pueden establecerse en suelos contaminados con arsénico y pueden crecer casi de manera normal dependiendo de la concentración de arsénico a la que están expuestas. Lo anterior lo realizan a través de las asociaciones simbióticas con microorganismos del suelo, en especial con MA quienes les proveen nutrientes e intervienen en la transformación química del arsénico a formas menos tóxicas, lo cual da a las plantas una ventaja para poder crecer bajo estas condiciones adversas.

En este trabajo se utilizó un aislamiento de *R. intraradices* aislado de la rizosfera del frijol con capacidad probada de colonización en plantas de *P. vulgaris* creciendo en sustrato contaminado con arsénico. El diseño fue factorial 2x3 al azar, evaluándose el PSP, PSR y variables de micorrización tanto en plantas inoculadas como no inoculadas que crecieron en sustratos con diferentes concentraciones de arsénico (0, 15 y 25 ppm). Se realizó un ANOVA y posteriormente comparación de medias Tukey. El mayor PSP se presentó en los tratamientos inoculados sin verse afectado por las concentraciones de arsénico utilizadas en este experimento, contrario al PSR donde a mayor concentración de arsénico se obtuvo menor biomasa.

Por otra parte, el porcentaje de micorrización se incrementó en el tratamiento contaminado con 15 ppm de arsénico, sin embargo, para el tratamiento a 25 ppm la micorrización se vio afectada. Sin embargo, la abundancia de arbuscúlos fue mayor en las plantas que crecieron a 25 ppm de arsénico, con estos resultados se demuestra la importancia de los arbuscúlos en el establecimiento de las plantas en suelo contaminado con arsénico. Se discuten las posibles interacciones tanto morfológicas como bioquímicas que suceden en la simbiosis en presencia de metales pesados.

Introducción

El riego con agua contaminada o el mal uso de agroquímicos que contienen arsénico, contribuye a que se incremente la cantidad de este metal pesado en suelos agrícolas. El arsénico no es un elemento esencial para las plantas, al contrario, es considerado carcinógeno y es una toxina peligrosa ya que este metal se puede almacenar en tallos, hojas o granos y puede llegar al humano al momento de consumir estas plantas contaminadas (**Zhao et al. 2010**). Por lo anterior, es de suma importancia monitorear los niveles de este contaminante en suelos y agua.

Las plantas son generalmente muy sensibles al arsénico, lo absorben del suelo en forma de arseniato, por lo cual esta es la forma más tóxica de arsénico para las plantas. Una planta que crece en suelos contaminados con arsénico va a ver su crecimiento disminuido debido a una disminución de la absorción por parte de las raíces, siendo estas el primer filtro para la absorción y translocación de arsénico al resto de la planta (**Abbas y Meharg 2008; Macnair y Cumbes 1987**).

El arsénico interfiere en la fotosíntesis, al inhibir el proceso de síntesis de clorofila y la actividad del fotosistema II, además, se cree que interfiere en el intercambio de gases (**Rahman et al. 2007; de Andrade et al. 2015**).

Las plantas se asocian con MA para soportar mejor las condiciones de estrés biótico y también abiótico como salinidad, sequía o para poder establecerse en suelos contaminados con metales pesados (**Auge 2008**). El micelio extra radical del hongo aumenta el área de absorción, al funcionar como una extensión de las raíces, pero el micelio no solo se limita a la adquisición de nutrientes, sino que modifica las propiedades de absorción de las raíces haciéndolas más selectivas a los elementos presentes en el suelo (**Smith y Read 2008**). De esta forma la asociación de una planta con una MA le confiere una mayor tolerancia al arsénico y una atenuación de la toxicidad, algo que se ha reportado en distintas especies de plantas (**González-Chavez et al. 2002; Chen et al. 2007**).

Las MA dependen de la planta para la adquisición de compuestos carbonados, ya que es la fuente de energía que la MA requiere para mantener sus funciones activas, esta demanda de carbón estimula la fotosíntesis en la planta, comportamiento se ha observado en plantas de maíz y arroz en condiciones de estrés abiótico (**Wright et al. 1998; Sheng et al. 2008**).

Con el fin de entender el rol de la simbiosis en el establecimiento de plantas en suelos contaminados con arsénico es que se ha propuesto al arroz como un modelo biológico para evaluar crecimiento, parámetros fisiológicos y de micorrización con distintas MA (**Project 2005**). Sin embargo, se requiere de mayor conocimiento en este mismo tema en leguminosas, en especial en *P. vulgaris*, por lo anterior en el experimento concerniente a este capítulo se evaluó mediante ensayos de invernadero la resistencia de la simbiosis *R. intraradices* – *P. vulgaris* a condiciones de estrés por arsénico presente en el suelo, tomando en cuenta variables de crecimiento de las plantas y variables de micorrización.

Material y métodos

Bioensayos en invernadero

El experimento con suelo contaminado con arsénico se realizó con los tratamientos especificados en la Tabla 12.

La mezcla de sustrato utilizado fue tierra:arena 2:3 esterilizada. Para la contaminación del sustrato con arsénico se utilizó arseniato dibásico sódico heptahidratado, $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tomando en cuenta el peso molecular del compuesto y el peso molecular de arsénico. Para la concentración de 15 ppm de arsénico se utilizaron 0.49 g de arseniato dibásico sódico heptahidratado diluidos en 300 ml de agua y rociados sobre 8 kg de sustrato; para la concentración de 25 ppm se utilizaron 0.83 g en 8 kg de sustrato. Una vez contaminado el sustrato se dejó secar a temperatura ambiente, ya que estuviera completamente seco se guardó en bolsas plásticas y se refrigeró hasta su utilización.

Se utilizaron semillas de frijol var. Pinto americano previamente desinfectadas, que se dejaron crecer en charolas de germinación. Las plántulas se retiraron al quinto día. De manera visual se seleccionaron 30 plantas para pasarlas a macetas, la selección se realizó con el fin de descartar aquellas semillas que no germinaron o plántulas que presentan un desarrollo fisiológico menor o por encima de la media.

Se utilizaron 5 macetas por tratamiento con 150 g de sustrato cada una. Para los tratamientos inoculados se utilizó 1 gramo de inóculo por maceta, cada gramo conteniendo 8 esporas de M4_RI. En cada maceta se sembró una plántula, dando un total de 30 macetas.

El diseño experimental consistió en un sistema factorial completamente al azar 2x3. El primer factor comprendió suelo inoculado y no inoculado con M4_RI, el segundo factor consistió en la cantidad de arsénico, 0, 15 y 25 ppm.

Tabla 12. Tratamientos utilizados y especificaciones de cada uno para la prueba de efectividad de la micorrización bajo estrés por suelo contaminado con arsénico a nivel de invernadero en plantas de frijol var. Pinto americano.

Tratamiento	Características
Ctrl NI	Control, no inoculado, sustrato sin contaminar
Ctrl I	Control, inoculado, sustrato sin contaminar
As15 NI	No inoculado, sustrato con arsénico a 15 ppm
As15 I	Inoculado, sustrato con arsénico a 15 ppm
As25 NI	No inoculado, sustrato con arsénico a 25 ppm
As25 I	Inoculado, sustrato con arsénico a 25 ppm

El experimento se realizó en el mes de marzo y abril, con una oscilación de temperaturas entre los 17 a 28°C. Las plantas se regaron cada tercer día con 80 ml de agua. El ensayo se mantuvo en crecimiento durante 35 días.

Muestreo y análisis de datos

Las variables que se midieron fueron: PSP, PSR, porcentaje de micorrización, M% y A%.

Para medir la colonización, se tiñeron las raíces utilizando la metodología propuesta por **Phillips y Hayman 1970**. Posteriormente se midió la micorrización en porcentaje utilizando el método de “presencia o ausencia de infección en el segmento total de la raíz” propuesto por **Hayman 1970**.

Para determinar la intensidad de la micorrización y la abundancia de arbusculos se utilizó la metodología propuesta por **Trouvelot et al. 1986**, los resultados finales se calcularon utilizando el programa informático mycocalc (ver. 1.0).

A los datos recabados se realizó prueba de ANOVA de una vía y posteriormente comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico IBM SPSS ver. 20, para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos y las variables analizadas.

Resultados

En el anexo 5 se pueden consultar las tablas ANOVA y las tablas de comparación de medias.

En la figura 22 se muestran las diferencias entre los distintos tratamientos en relación con el PSP. Cabe destacar que entre los controles no inoculado (0.60 g) e inoculado (0.67 g) así como inoculado arsénico 15 (0.66 g) e inoculado arsénico 25 (0.60 g) se agruparon en el mismo subconjunto, obteniendo también los valores medios más altos del análisis. Por otra parte, los tratamientos no inoculados de arsénico 15 y 25 obtuvieron los valores medios más bajos (0.40 g y 0.37 g respectivamente) diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos ($P < 0.001$).

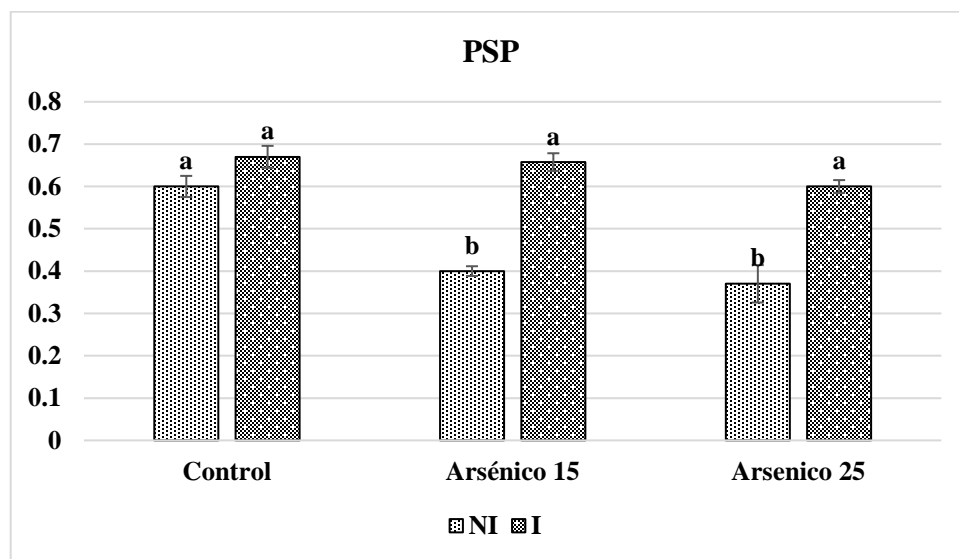


Figura 22. Valores medios obtenidos en peso seco de planta entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.

En la figura 23 se muestran las diferencias en PSR entre los diferentes tratamientos, se observa que conforme a mayor concentración de arsénico se presenta una menor biomasa de raíz. Los tratamientos control obtuvieron los valores medios más altos (0.58 g para el tratamiento no inoculado y 0.54 g para el inoculado) diferenciando significativamente del resto de los tratamientos ($P < 0.001$). El valor más bajo se presentó en el tratamiento arsénico 25 inoculado con 0.3 g.

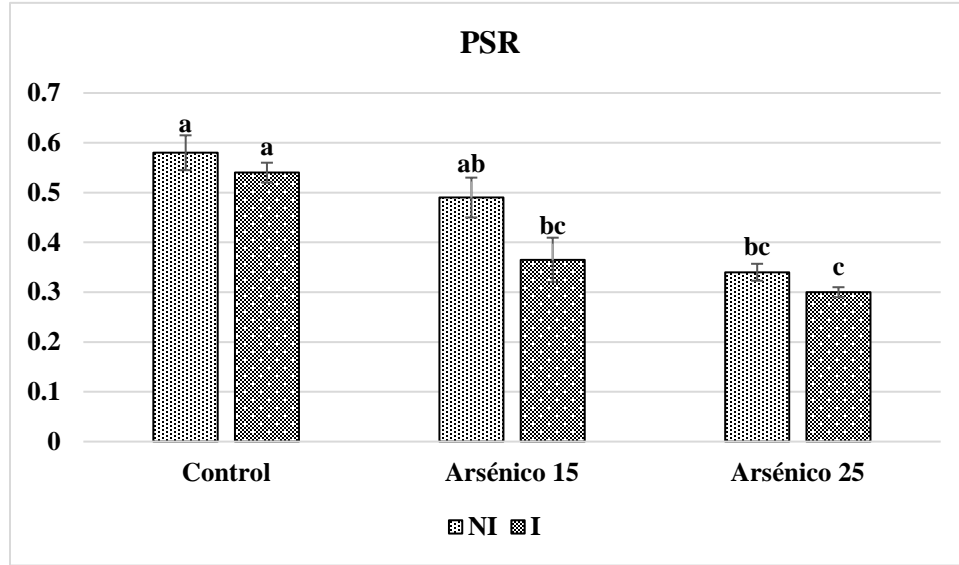


Figura 23. Valores medios obtenidos en peso seco de raíz entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.

Como se aprecia en la tabla 13 el tratamiento arsénico 15 obtuvo el mayor porcentaje de micorrización (36.36%) se diferenció significativamente del control y del tratamiento arsénico 25 ($P=0.015$), este último tratamiento obtuvo el porcentaje medio más bajo (30.24%).

Tabla 13. Valores medios obtenidos en porcentaje de micorrización entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.

	Micorrización
Control	35.04 ± 1.037 ab
Arsénico 15	36.36 ± 1.749 a
Arsénico 25	30.24 ± 0.560 b

En la figura 24 se observa la abundancia de arbusculos. Se encontraron diferencias significativas en los tres tratamientos inoculados ($P<0.001$). El tratamiento arsénico 25 presentó la mayor abundancia de arbusculos con una media de 4.63% el tratamiento control presentó el menor porcentaje de abundancia de arbusculos con 0.97%.

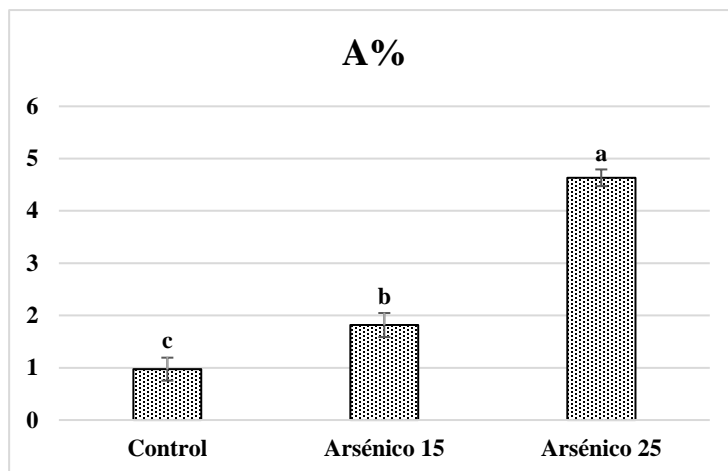


Figura 24. Valores medios obtenidos en abundancia de arbusculos entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.

Respecto a la intensidad de micorrización el control obtuvo el mayor porcentaje con 2.65% diferenciándose significativamente de los demás tratamientos ($P=0.024$), el tratamiento arsénico 25 obtuvo el porcentaje medio más bajo con 0.94% (figura 25).

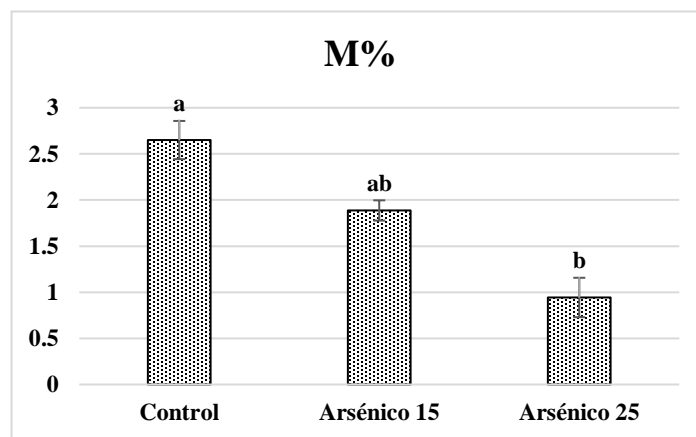


Figura 25. Valores medios obtenidos en intensidad de micorrización entre los diferentes tratamientos en el experimento de arsénico a nivel de invernadero.

Discusión

Glomus mosseae es una especie de MA de interés por su conocida capacidad de tolerar altas concentraciones de arsénico (**Leung et al. 2010**), sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que *R. intraradices* reduce la influencia tóxica del arsénico en plantas de *P. vulgaris* var. Pinto Americano hasta una concentración de arsénico de 25 ppm, aún y cuando los niveles de micorrización son bajos. Cabe señalar que la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 menciona que la concentración máxima de arsénico permitida en suelos de uso agrícola es de 22 ppm.

La cantidad de arsénico no influyó en el PSP de las plantas de frijol para los tratamientos inoculados, manteniendo la biomasa igual que el control inoculado, contrariamente a los resultados obtenidos por **Gray et al. 2003** en *Leymus cinereus*, donde las plantas micorrizadas no obtuvieron mayor biomasa. Por otra parte, se ha reportado poca toxicidad e incremento de biomasa en plantas de *Holcus lanatus* micorrizadas con *Glomus mosseae* en suelos contaminados con arsénico (**González-Chavez et al. 2002**), a su vez, **Agely et al. 2005** reportan un incremento del peso seco en *Pteris vittata* a 100ppm de arsénico. Esto se debe a que las hifas liberan sustancias orgánicas que promueven la metilación, desmetilación, reducción y oxidación de las distintas formas de arsénico, además recientemente se ha comprobado que las MA (específicamente *R. intraradices*) tienen un papel importante en la transformación del arsénico en ácido dimetil arsénico, una forma mucha menos tóxica de este metal pesado, favoreciendo mediante estos mecanismos el establecimiento de las plantas en suelos contaminados (**Ultra et al. 2007; Gadd 2004; Li et al. 2016**).

Como era de esperarse en las plantas no inoculadas el PSP se vio afectado negativamente en las concentraciones de arsénico evaluadas en esta investigación. Cabe señalar que se observaron síntomas de toxicidad en las plantas como hojas amarillentas en la concentración de 25 ppm no llegando a ser esta concentración letal, lo anterior se debe a que el arsénico interrumpe la fosforilación oxidativa y la producción de ATP, además de que la presencia de arsénico modifica el metabolismo de la planta para producir antioxidasas y fitoquelatinas para aliviar el estrés (**Oremland y Stolz 2003; Cao et al. 2004; Zhao et al. 2003; Li et al. 2018**). En cuanto al PSR, se vio afectado por las

concentraciones de arsénico utilizadas, sin embargo, en experimentos con arroz en suelo contaminado con arsénico a 2 y 8 micro molar las raíces no se ven afectadas en su biomasa (**Chen et al. 2012**).

La concentración de 25 ppm de arsénico afectó negativamente el porcentaje de micorrización, sin embargo, el establecimiento de la simbiosis implica diversos factores entre suelo-planta-hongo (**Wu et al. 2009**). La concentración de arsénico 15 ppm propició un mayor porcentaje de micorrización que el resto de los tratamientos, comportamientos similares de la simbiosis se han reportado en plantas de *Oryza sativa*, *Pteris vittata* y *Medicago sativa* (**Li et al. 2016; Agely et al. 2005; Chen et al. 2007; Chen et al. 2012**) donde se ha observado que a niveles moderados de contaminación con metales pesados la MA suele ser más eficiente para colonizar raíces y que conforme se aumenta la concentración de metal pesado esa eficiencia va bajando.

Al contrario de lo que sucede con el porcentaje de micorrización, la abundancia de arbusculos aumentó aún en concentración de 25 ppm de arsénico, este resultado era de esperarse ya que **González-Chavez et al. 2002** reporta en *G. mosseae* una inhibición de germinación de las esporas en concentraciones de 50ppm de arsénico y **Li et al. 2016** reporta cantidades de 60ppm de arsénico donde *R. intraradices* ha logrado colonizar plantas de arroz.

Los arbusculos son fundamentales en una simbiosis exitosa, ya que son los puntos de conexión e intercambio de nutrientes entre las MA y las plantas, por lo cual se puede inferir que en concentraciones de arsénico a 25ppm la MA prioriza la formación de arbusculos con el fin de subsistir junto con la planta huésped en un ambiente hostil.

Por otra parte, la intensidad de la micorrización si se vio afectada por el arsénico, donde, a mayor concentración de arsénico, menor M%. Esto confirma la toxicidad del arsénico para con la MA, algo que se ha observado en plantas de arroz inoculadas con *R. irregularis* (**de Andrade S et al. 2015**). Es importante mencionar que la M% y la A% no necesariamente deben estar relacionados (a pesar de que ambos parámetros son cualitativos), ya que la A% es un parámetro más específico al ser orientado totalmente a los arbusculos debido a la importancia de esta estructura para una simbiosis eficiente.

CONCLUSIONES

La diversidad presente en la rizosfera de frijol de muestras de suelo procedentes del estado de Puebla consta de 4 especies de MA de los géneros, *Rhizophagus*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Gigaspora*. Siendo el género *Rhizophagus* el que con más frecuencia se encuentra asociado.

Bajo condiciones óptimas de crecimiento, se obtiene una respuesta favorable en las variables medidas en la interacción MA-Frijol con respecto al testigo absoluto y tratamiento fertilizado.

El aislamiento de *Rhizophagus intraradices*, identificado como M4_RI, fue seleccionado debido a su alta eficiencia en micorrización y producción de esporas en plantas de frijol var. Pinto Americano.

M4_RI confiere a las plantas de frijol var. Pinto americano una resistencia a estrés de tipo hídrico, que se refleja en una mayor biomasa y para la simbiosis en mayores porcentajes de micorrización y abundancia de arbusculos.

M4_RI confiere a las plantas de frijol var. Pinto americano una tolerancia para crecer en sustratos contaminados con metales pesados, específicamente plomo y arsénico, esto se refleja en una mayor biomasa y para la simbiosis en mayores porcentajes de micorrización y abundancia de arbusculos.

La abundancia de arbusculos es determinante para la supervivencia de plantas de frijol en sustratos contaminados con plomo y arsénico.

Los hongos micorrízicos arbusculares tienen una influencia positiva en el desarrollo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Pinto Americano en determinadas condiciones de estrés.

PERSPECTIVAS

Dentro de esta investigación se trató de conocer parte de los hongos micorrízicos que conforman el microbiota en la rizosfera de frijol y como estos hongos pueden ser utilizados para solventar situaciones de estrés abiótico particulares en plantas de frijol.

Ante el potencial de estos microorganismos para ser utilizados en favor de la producción agrícola, es imperante que continúen las investigaciones enfocadas a conocer las especies componentes de la rizosfera del frijol, así como las interacciones ecológicas que puede haber entre especies de distintos reinos, sin dejar a un lado los estudios a nivel de invernadero y campo para determinar los potenciales beneficios del uso de estos microorganismos y su viabilidad para utilizarlos en productos comerciales más específicos que los que se encuentran actualmente en el mercado.

Por otra parte, se requieren investigaciones a nivel bioquímico y genético para conocer y entender los mecanismos de señalización, transferencia de nutrientes y tolerancia al estrés en este tipo de relación simbiótica.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas MH y Meharg AA. 2008. Arsenate, arsenite and dimethyl arsenic acid (DMA) uptake and tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil* 304:277–289.

Abdel-Fattah GM. 1997. Functional activity of va-mycorrhiza (*Glomus mosseae*) in the growth and productivity of soybean plants grown in sterilized soil. *Folia Microbiologica* 42:5, pp. 495-502.

Agely AA, Sylvia DM, MA LQ. 2005. Mycorrhizae increase arsenic uptake by the hyperaccumulator chinese break fern (*Pteris vittata* L.). *Journal of Environmental Quality* 34:2181-2186.

Aguirre J.F, Irizar M.B, Duran A, Grajeda O.A, Peña M.A, Loredó C, Gutiérrez A. 2009. Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México, [Online]. Disponible en: http://www.redsicta.org/rhizobium_Pdf/BIOFERTILIZANTES%20MICROBIANOS.pdf

Alarcón A y Ferrera R. 2000. Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura técnica en México, [Online]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60826207>

Al-Karaki G. McMichael B, Zak J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14:263-269.

Al-Karaki GN, Clark RB. 1998. Growth, mineral acquisition and water use by mycorrhizal wheat grown under water stress. *Journal of Plant Nutrition* 21:263-276.

Alloush GAZ, Zeto SK, Clark RB. 2000. Phosphorus source, organic matter and arbuscular mycorrhiza effects on growth and mineral acquisition of chickpea grown in acidic soil. *Journal of Plant Nutrition* 23:1351-1369.

Andrade SAL, Abreu CA, de Abreu MF, Silveira APD. 2004. Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. *Applied Soil Ecology* 26:123-131

de Andrade S, Pereira A, Mazzafera P. 2015. Photosynthesis is induced in rice plants that associate with arbuscular mycorrhizal fungi and are grown under arsenate and arsenite stress. *Chemosphere* 134:141-149.

Aroca R, Vernieri P, Ruiz Lozano JM. 2008. Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of Experimental Botany* 59:2029-2041.

Athar M. 2005. Nodulation of native legumes in Pakistani rangelands. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 70:49-54.

Auge RM. 2004. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science* 84:373-381

Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124:949-958

Ballesteros-Almanza L, Altamirano -Hernandez J, Peña -Cabriales JJ, Santoyo G, Sanchez -Yañez JM, Valencia -Cantero E, Macias -Rodriguez L, Lopez -Bucio J, Cardenas -Navarro R, Farias -Rodriguez R. 2010. Effect of co-inoculation with mycorrhiza and rhizobia on the nodule trehalose content of different bean genotypes. *The Open Microbiology Journal* 17:83-92.

Bauddh K, Kumar A, Srivastava S, Singh RP, Tripathi RD. 2016. A study of the effect of cadmium on the antioxidative defense system and alteration in different functional groups in castor bean and Indian mustard. *Archives of Agronomy and Soil Science* 62:877-891.

Bhattacharjee S, Sharma GD. 2012. Effect of dual inoculation of arbuscular mycorrhiza and rhizobium on the chlorophyll, nitrogen and phosphorus contents of pigeon pea. *Advances in Microbiology* 2:561-564.

Blum A. 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research* 56:1159-1168.

Cao X, Ma LQ, Tu C. 2004. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environmental Pollution* 128:317–325.

Chen X, Tang J, Zhi GY, Hu SJ. 2005. Arbuscula mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. *Applied Soil Ecology* 28:259-269.

Chen B, Xiaio X, Zhu YG, Smith FA, Xie ZM, Smith SE. 2007. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn. *Science of the Total Environment* 379(2-3):226-234.

Chen X, Li H, Chan WF, Wu C, Wu F, Wu S, Wong MH. 2012. Arsenite transporters expression in rice (*Oryza sativa* L.) associated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonization under different levels of arsenite stress. *Chemosphere* 89(10):1248-1254.

CONABIO (s.f.) *Phaseolus vulgaris* L. Frijol silvestre. [Online]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.htm>

Dueck AT, Visser P, Ernst WHO, Schat H. 1986. Vesicular arbuscular mycorrhizal decrease zinc toxicity to grasses growing in Zn polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry* 18, 331–333

Duponnois R, Colombet A, Hien V, Thioulouse J. 2005. The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbia activity in the rhizosphere of *Acacia boloseriea*. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1460-1468.

- Elhazzat N, Artib M, Touati J, Chliyah M, Selmaoui K, Ouazzani T, Amina B, Douira A. 2018. Diversity of endomycorrhizal fungi in the rhizosphere of chickpea in Morocco. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 53:181-193.
- Eom A, Hartnett H, Wilson GW. 2000. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia* 122:435–444.
- de Fatima D, Barbosa M, dos Santos J, Araujo F, Siqueira J, Carbone MA. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi favor the initial growth of *Acacia mangium*, *Sorghum bicolor*, and *Urochloa brizantha* in soil contaminated with Zn, Cu, Pb, and Cd. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 101(3):386-391.
- Fonseca HMA, Berbara LL, Daft MJ. 1993. The effect of arbuscular mycorrhizal colonization on growth, phosphorus uptake and distribution and nitrogenase activity in *Glycine max* (L.) Merr. CV Clarck. Proceeding of the 9th North American Conference on Mycorrhizae.
- Gadd GM. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122(2-4):109-119.
- García D, Cantero J, Moora M, Öpik M, Davison J, Vasar M, Jairus T, Zobel M. 2018. Soybean cultivation supports a diverse arbuscular mycorrhizal fungal community in central Argentina. *Applied Soil Ecology* 124:289-297.
- Gerdemann J. 1975. Vesicular arbuscular mycorrhizae. The development and function of roots. *Prensa Academia Londres*, pp. 578.
- Gerdemann J, Nicolson T.H. (1963) Spores of mycorrhizal endogene extracted from Soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235-244.
- Gianinazzi S, Vosatka M. 2004. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Canadian Journal of Botany* 82:1264-1271.

- Giovannini L, Palla M, Agnolucci M, Avio L, Sbrana C, Turrini A, Giovannetti M. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota as plant biostimulants: research strategies for the selection of the best performing inocula. *Agronomy* 10(1):106.
- Godbold DL y Kettner C. 1991. Lead influences root growth and mineral nutrition of *Picea abies* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 139:95–99
- Göhre V y Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223:1115–1122.
- Gong M, Tang M, Chen H, Zhang Q, Feng X. 2013. Effects of two *Glomus* species on the growth and physiological performance of *Sophora davidii* seedlings under water stress. *New Forest* 44:399-408.
- González-Chavez C, Harris PJ, Dodd J, Meharg AA. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on *Holcus lanatus*. *New Phytologist* 155:163-171.
- González-Guerrero M, Escudero V, Saenz A, Jimenez TM. 2016. Transition metal transport in plants and associated endosymbionts: Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. *Frontiers in Plant Science*. 7:1088. doi:10.3389/fpls.2016.01088.
- Gray T, Hedin R, Smith E. 2003. Role of Mycorrhizal Fungi and Phosphorus in the Arsenic Tolerance of Basin Wildrye. *Ecosystem Restoration* 95(622):45-47.
- HaiRu J, Jie L, Jing L, Xiao H. 2012. Forms of nitrogen uptake, translocation, and transfer via arbuscular mycorrhizal fungi: A Review. *Science China Life Sciences* 55:6, pp. 474-482.
- Hall I. 1979. Soil pellets to introduce vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi into soil. *Soil Biology and Biochemistry* 11:85-86.
- Hayman D.S. 1970. Endogone spore numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. *Transactions of the British Mycological Society* 54-53-63

Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68:139–146.

Ibijbijen J, Urquiaga S, Ismaili M, Alves BJR, Boddey RM. 1996. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition and nitrogen fixation of three varieties of common beans. *New Phytologist* 134:353-360.

INVAM. 2011. International culture collection of (vesicular) arbuscular mycorrhizal fungi, [Online]. Disponible en: <http://invam.caf.wvu.edu>

Jain AK, Kumar S, Panwar JD. 2007. Role of rhizobium, phosphorus and micronutrients on growth and modulation of green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilcox). *Advances in Plant Science* 20(2):337-339.

Kawai T y Tokeshi M. 2007. Testing the facilitation-competition paradigm under the stress-gradient hypothesis: decoupling multiple stress factors. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:2503–2508.

Khade SW y Adholeya A. 2009. Arbuscular mycorrhizal association in plants growing on metal-contaminated and non-contaminated soils adjoining Kanpur Tanneries, Uttar Pradesh, India. *Water, Air and Soil Pollution* 202:45–56.

Kjøller R, Rosendahl S. 2001. Molecular diversity of glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field grown peas fungi. *Mycological Research* 105:9, pp. 1027-1032.

Kucey M.N, Paul E. 1983. Vesicular arbuscular mycorrhizal spore populations in various Saskatchewan soils and the effect of inoculations with *Glomus mosseae* on faba bean growth in greenhouse and field trials (*Vicia faba*). *Canadian Journal of Soil Science* 63, pp. 87-95.

Lekberg Y, Waller L. 2016. What drives differences in arbuscular mycorrhizal fungal communities among plant species? *Fungal Ecology* 24:135-138.

Lenoir I, Lounes-Hadj A, Fontaine J. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal-assisted phytoremediation of soil contaminated with persistent organic pollutants: a review. *European Journal of Soil Science* 67(5):624-640.

Leung H, Wu F, Cheung K, Hong Z, Hung M. 2010. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate amendment on arsenic uptake, accumulation and growth of *Pteris vittata* in as-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 12(4):384-403.

Li T, Hu YJ, Hao ZP, Li H, Wang YS, Chen BD. 2012. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 197:617-6.

Li H, Chen X, Wong M. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi reduced the ratios of inorganic/organic arsenic in rice grains. *Chemosphere* 145:224-230.

Li J, Sun Y, Zhang X, Hu Y, Li T, Zhang X, Wang Z, Wu S, Wu Z, Chen B. 2018. A methyltransferase gene from arbuscular mycorrhizal fungi involved in arsenic methylation and volatilization. *Chemosphere* 209(18):392-400.

Macnair MR y Cumbes Q. 1987. Evidence that arsenic tolerance in *Holcus lanatus* L. is caused by an altered phosphate uptake system. *New Phytologist* 107:387–394.

Madejon E, Doronila AI, Sanchez-Palacios JT, Madejon P, Baker AJM. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and biosolids enhance the growth of a native Australian grass on sulphidic gold mine tailings. *Restoration Ecology* 18:175-183.

Mahanta D, Rai R.K, Dhar S, Varghese E, Raja A, Purakayastha T.J. 2018. *Ecological Engineering* 111, pp.31-43.

Martínez MA, Osuna ES, Padilla JS, Acosta JA, Loredó C. 2008. Tecnología para la producción de frijol en el norte centro de México. Libro técnico No. 4. Campo experimental San Luis CIRNE-INIFAP. 206 p.

Marulanda A, Azcon R, Ruiz -Lozano JM. 2003. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum* 119:526-533.

Mathimaran N, Mahaveer P, Sharma M, Mohan RB, Bagyaraj DJ. 2017. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and drought tolerance in crop plants. *Mycosphere* 8(3):361-376.

Mireles F, Davila JI, Pinedo JL, Reyes E, Speakman RJ, Glascock MD. 2012. Assessing urban soil pollution in the cities of Zacatecas and Guadalupe, Mexico by instrumental neutron activation analysis. *Microchemical Journal* 103:158-164.

Mohammadi K, Khalesro S, Shorabi Y, Heidari G. 2011. A review: beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* 1:310-319

Mortimer PE, Le Roux MR, Pérez-Fernández MA, Benedito VA, Kleinert A, Xu J, Valentine AJ. 2012. The dual symbiosis between arbuscular mycorrhiza and nitrogen fixing bacteria benefits the growth and nutrition of the woody invasive legume *Acacia cyclops* under nutrient limiting conditions. *Plant and Soil* 366 (1-2):229-241.

Mosse B. 1973. The role of mycorrhiza in phosphorus solubilization. *Global impacts of applied microbiology*. Cuarta conferencia internacional. Sao Paulo, Brasil.

Murat E, Demir S, Tufenkei EOS, Oguz F, Akkopru A. 2011. Effects of rhizobium, arbuscular mycorrhiza and whey applications on some properties in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under irrigated and rainfed conditions. *Field Crops Research* 122(1):14-24.

Olalde PV, Serratos R. 2004. Biofertilizantes: micorrizas y bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Simposium de Biofertilización “la Biofertilización como tecnología sostenible”. Rio Bravo, Tamaulipas.

Oremland RS, Stolz JF. 2003. The ecology of arsenic. *Science*. 300:939-944.

Öpik M, Peay K.G. 2016. Mycorrhizal diversity: diversity of host plants, symbiotic fungi and relationships. *Fungal Ecology* 24:B, pp. 103-105.

Pellegrino E, Bedini S. 2014. Enhancing ecosystem services in sustainable agriculture: biofertilization and biofortification of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 68:429-439.

Phillips J.M, Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycological Society* 55:1, pp. 158-161.

Porcel R, Aroca R, Azcon R, Ruiz-Lozano JM. 2006. PIP aquaporin gene expresión in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology* 60:389-404.

Porcel R, Ruiz -Lozano JM. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 55:1743-1750.

Power ME, Mills LS. 1995. The keystone cops meet in hilo. *Trends in Ecology and Evolution* 10:182-184.

Project IRGS. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793–800.

Qiangsheng WU, Renxue XIA. 2006. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on leaf solutes and root absorption areas of trifoliolate orange seedlings under water stress conditions. *Frontier for China* 3:312-317.

Rahman M, Hasegawa H, Mahfuzur M, Nazrul M, Majid M, Tasmien A. 2007. Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. *Chemosphere* 67:1072–1079.

Rahman MK, Kabir SM, Mohsin GM, Alam MD, Mandal R. 2008. Effects of inoculation with arbuscular-mycorrhizal fungi and phosphorus on growth, yield and nutrient uptake of mungbean grown in sterile and nonsterile soil. *Journal of Phytochemical Research* 21(2):247-251.

- Raviv M. 2010. The use of mycorrhiza in organically grown crops under semiarid conditions: A review of benefits, constraints and future challenges. *Symbiosis* 52:65-74.
- Rillig MC, Wright SF, Nichols KA, Schmidt WF, Torn MS. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil* 233:167–177.
- Ruiz -Lozano JM, Azcon R, Gomez M. 1995. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied Environmental Microbiology* 61:456-460.
- Schüßler A, Walker C. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Gloucester, UK, pp. 1-58.
- Setyaningsih L, Setiadi Y, Budi SW, Hamim, Sopandie D. 2017. Lead accumulation by jabon seedling (*Anthocephalus cadamba*) on tailing media with application of compost and arbuscular mycorrhizal fungi. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 58.
- Sharma P y Dubey RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:35-52.
- Sharma N, Yadav K, Cheema J, Badda N, Aggarwal A. 2015. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis and Water Stress: A Critical Review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 38(4):427-453.
- Sheng M, Tang M, Chen H, Yang B, Zhang F, Huang Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* 18:287–296.
- Shetty KG, Hetrick BAD, Fiffe DAH, Schwab AP. 1994. Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mined spoil. *Environmental Pollution* 86:181–188

SIAP (s.f.) Frijol *Phaseolus vulgaris* [Online]. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=171&Itemid=81

Singh PK, Singh AK. 2010. Response of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) in relation to micronutrients content and yield as affected by sulfur and cobalt application. *Environment and Ecology* 28(1B):564-568.

Singh S, Gupta AK, Kaur N. 2012. Differential responses of antioxidative defense system to long-term field drought in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes differing in drought tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Sciences* 198:185-189.

Singh G, Pankaj U, Chand S, Kumar R. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoextraction of toxic metals by *Zea mays* L. from tannery sludge. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 28(8): 729-746.

Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Tercera edición. New York:Academic Press.

Souza J, Oehl F, Pereira C.D, de Torres de Toledo C, Coyne D, Alves D.K, Costa L. 2017. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian's Cerrado and in soybean under conservation and conventional tillage. *Applied Soil Ecology* 117-118:178-189.

Sprent JI, James EK. 2007. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology* 144:575-581.

Subramanian KS, Santhanakrishnan P, Balasubramanian P. 2006. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae* 107:245-253.

Tiwari J, Ma Y, Baudhdh K. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi: an ecological accelerator of phytoremediation of metal contaminated soils. *Archives of Agronomy and Soil Science* DOI: 10.1080/03650340.2020.1829599.

Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi S. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* 217-221.

Ulloa J.A, Rosas P, Ramírez J.C, Ulloa B. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente* 3 (8), pp. 5-9.

Ultra VU, Tanaka S, Sakurai K, Iwasaki k. 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. *Plant and Soil* 290:29-41.

Verma S, Dubey RS. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sciences* 164:645-655.

Villaseñor R, Espinosa F. 1998. Catálogo de malezas de México. Consejo nacional consultivo fitosanitario. Fondo de cultura económica. México, D.F.

Vodnik D, Grcman H, Macek I, van Elteren JT, Kovacevic M. 2008. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment* 392(1):130-136.

Wright D, Read D, Scholes J. 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21:881-891.

Wu QS, Xia RX, Zou YN. 2006. Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress. *Journal of Plant Physiology* 163:1101-1110.

Wu FY, Ye ZH, Wong MH. 2009. Intraspecific differences of arbuscular mycorrhizal fungi in their impacts on arsenic accumulation by *Pteris vittata* L. *Chemosphere* 76(9):1258-1264.

Yang Y, Liang Y, Ghosh A, Song Y, Chen H, Tang M. 2015. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi status and heavy metal accumulation characteristics of tree species in a

lead-zinc mine area: potential applications for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: 10.1007/s11356-015-4521-8

Yang Y, Liang Y, Han X, Chiu TY, Ghosh A, Chen H, Tang M. 2016. The roles of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation and three-herb interactions in Pb contaminated soil. *Scientific Reports* DOI: 10.1038/srep20469.

Yaseen T, Ali K, Munsif F, Rab A, Ahmad M, Israr M, Baraich AK. 2016. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobium inoculation and rock phosphate on growth and quality of lentil. *Pakistan Journal of Botany* 48:5 pp. 2101-2107.

Zhao FJ, Wang JR, Barker JHA, Schat H, Bleeker PM, McGrath SP. 2003. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytologist*. 159:403-410.

Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA. 2010. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual Reviews of Plant Biology* 61:535–559.

Zhu X, Song F, Xu H. 2010. Influence of arbuscular mycorrhiza on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of maize plants under temperature stress. *Mycorrhiza* 20:325-332.

ANEXO 1

Tablas estadísticas capítulo 1

Altura de la planta

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: AP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	7734.015 ^a	10	773.402	118.636	.000
Intersección	62766.565	1	62766.565	9628.116	.000
Tratamiento	7734.015	10	773.402	118.636	.000
Error	143.420	22	6.519		
Total	70644.000	33			
Total corregida	7877.435	32			

a. R cuadrado = .982 (R cuadrado corregida = .974)

AP

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
M2_RI	3	26.4333			
M2_FM	3	26.9000			
M1_RI	3	27.3000			
M3_RI	3	30.8000			
M5_GA	3	31.9667			
M4_GA	3		42.3667		
M1_GA	3		47.0000	47.0000	
M5_SC	3			53.2000	
M4_RI	3				62.7667
M2_SC	3				63.5333
M5_RI	3				67.4667
Sig.		.281	.513	.163	.494

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 6.519.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Longitud de raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: LR

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	820.209 ^a	10	82.021	15.950	.000
Intersección	21148.278	1	21148.278	4112.511	.000
Tratamiento	820.209	10	82.021	15.950	.000
Error	113.133	22	5.142		
Total	22081.620	33			
Total corregida	933.342	32			

a. R cuadrado = .879 (R cuadrado corregida = .824)

LR

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
M2_RI	3	18.0000				
M5_GA	3	19.5000				
M2_FM	3	20.3000	20.3000			
M1_GA	3	21.3333	21.3333	21.3333		
M5_RI	3	24.2000	24.2000	24.2000	24.2000	
M1_RI	3		26.4000	26.4000	26.4000	
M5_SC	3			27.0000	27.0000	
M4_GA	3				28.2667	
M2_SC	3				28.3333	
M3_RI	3				29.6667	29.6667
M4_RI	3					35.4667
Sig.		.080	.089	.139	.169	.121

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 5.142.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Peso fresco de planta

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PFP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	12.328 ^a	10	1.233	6.869	.000
Intersección	579.603	1	579.603	3229.530	.000
Tratamiento	12.328	10	1.233	6.869	.000
Error	3.948	22	.179		
Total	595.879	33			
Total corregida	16.276	32			

a. R cuadrado = .757 (R cuadrado corregida = .647)

PFP

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
M5_SC	3	3.2200		
M1_RI	3	3.5267	3.5267	
M4_RI	3	3.5867	3.5867	
M2_SC	3	3.8567	3.8567	
M1_GA	3	4.1233	4.1233	
M3_RI	3	4.1767	4.1767	
M2_FM	3	4.2700	4.2700	4.2700
M5_RI	3		4.5633	4.5633
M4_GA	3		4.6133	4.6133
M5_GA	3		4.6733	4.6733
M2_RI	3			5.4900
Sig.		.146	.085	.055

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .179.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Peso fresco de raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PFR

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	10.270 ^a	10	1.027	8.352	.000
Intersección	72.817	1	72.817	592.125	.000
Tratamiento	10.270	10	1.027	8.352	.000
Error	2.705	22	.123		
Total	85.793	33			
Total corregida	12.976	32			

a. R cuadrado = .791 (R cuadrado corregida = .697)

PFR

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
M4_GA	3	.6200			
M5_SC	3	.9033	.9033		
M2_FM	3	.9800	.9800		
M3_RI	3	1.1600	1.1600		
M2_RI	3	1.4267	1.4267	1.4267	
M1_RI	3	1.5000	1.5000	1.5000	
M5_GA	3	1.5367	1.5367	1.5367	
M4_RI	3	1.5867	1.5867	1.5867	
M2_SC	3		1.7767	1.7767	1.7767
M1_GA	3			2.1933	2.1933
M5_RI	3			2.6567	2.6567
Sig.		.075	.142	.271	.136

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .123.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Peso seco planta

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.082 ^a	10	.008	3.133	.012
Intersección	7.069	1	7.069	2686.420	.000
Tratamiento	.082	10	.008	3.133	.012
Error	.058	22	.003		
Total	7.209	33			
Total corregida	.140	32			

a. R cuadrado = .587 (R cuadrado corregida = .400)

PSP

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
M2_SC	3	.3560	
M5_SC	3	.4143	.4143
M5_GA	3	.4337	.4337
M2_RI	3	.4400	.4400
M1_GA	3	.4477	.4477
M4_RI	3	.4700	.4700
M3_RI	3	.4800	.4800
M1_RI	3	.4840	.4840
M5_RI	3	.4977	.4977
M4_GA	3		.5307
M2_FM	3		.5370
Sig.		.074	.177

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .003.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Peso seco de raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSR

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1.600 ^a	10	.160	14.260	.000
Intersección	2.221	1	2.221	197.910	.000
Tratamiento	1.600	10	.160	14.260	.000
Error	.247	22	.011		
Total	4.068	33			
Total corregida	1.847	32			

a. R cuadrado = .866 (R cuadrado corregida = .806)

PSR

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
M2_FM	3	.0983	
M2_RI	3	.1107	
M5_SC	3	.1167	
M5_GA	3	.1190	
M3_RI	3	.1693	
M5_RI	3	.1713	
M2_SC	3	.2097	
M4_GA	3	.2547	
M4_RI	3	.3170	
M1_RI	3	.3900	
M1_GA	3		.8970
Sig.		.076	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .011.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Micorrización

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Micorrización

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3439.212 ^a	10	343.921	83.451	.000
Intersección	143484.121	1	143484.121	34816.000	.000
Tratamiento	3439.212	10	343.921	83.451	.000
Error	90.667	22	4.121		
Total	147014.000	33			
Total corregida	3529.879	32			

a. R cuadrado = .974 (R cuadrado corregida = .963)

Micorrización

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
M2_SC	3	54.00					
M2_RI	3	55.00	55.00				
M2_FM	3	56.00	56.00	56.00			
M5_GA	3		60.00	60.00	60.00		
M1_GA	3			61.00	61.00		
M5_SC	3			61.00	61.00		
M5_RI	3				64.00		
M4_GA	3					75.00	
M4_RI	3					75.00	
M1_RI	3					80.33	80.33
M3_RI	3						84.00
Sig.		.975	.151	.151	.402	.103	.520

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática(Error) = 4.121.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Esporas por 10 gramos

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: e_10g

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2977.879 ^a	10	297.788	467.952	.000
Intersección	6837.121	1	6837.121	10744.048	.000
Tratamiento	2977.879	10	297.788	467.952	.000
Error	14.000	22	.636		
Total	9829.000	33			
Total corregida	2991.879	32			

a. R cuadrado = .995 (R cuadrado corregida = .993)

e_10g

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
M1_GA	3	4.3333					
M2_RI	3	4.3333					
M5_GA	3	4.3333					
M2_SC	3	5.6667					
M5_SC	3		9.0000				
M3_RI	3		9.3333				
M4_RI	3			19.6667			
M5_RI	3				22.3333		
M4_GA	3				23.6667	23.6667	
M2_FM	3					24.6667	
M1_RI	3						31.0000
Sig.		.622	1.000	1.000	.622	.892	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .636.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

ANEXO 2

Tablas estadísticas capítulo 2

Altura de la planta

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: AP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	4039.706 ^a	5	807.941	6.853	.000
Intersección	123778.584	1	123778.584	1049.895	.000
Tratamiento	4039.706	5	807.941	6.853	.000
Error	6366.390	54	117.896		
Total	134184.680	60			
Total corregida	10406.096	59			

a. R cuadrado = .388 (R cuadrado corregida = .332)

AP

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
Testigo	10	33.6000		
M1_GA	10	39.9600	39.9600	
M1_RI	10	43.9300	43.9300	
M5_SC	10	45.0000	45.0000	
Fertilizado	10		50.1200	50.1200
M4_RI	10			59.9100
Sig.		.193	.307	.347

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 117.896.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000

b. Alfa = .05.

Longitud de raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: LR

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	394.057 ^a	5	78.811	.790	.561
Intersección	48183.668	1	48183.668	483.058	.000
Tratamiento	394.057	5	78.811	.790	.561
Error	5386.345	54	99.747		
Total	53964.070	60			
Total corregida	5780.402	59			

a. R cuadrado = .068 (R cuadrado corregida = -.018)

LR

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto
		1
Testigo	10	24.4700
M1_RI	10	26.1500
Fertilizado	10	27.7300
M4_RI	10	28.9300
M5_SC	10	30.8800
M1_GA	10	31.8700
Sig.		.566

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 99.747.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000

b. Alfa = .05.

Peso seco de planta

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2.237 ^a	5	.447	89.634	.000
Intersección	25.356	1	25.356	5080.669	.000
Tratamiento	2.237	5	.447	89.634	.000
Error	.269	54	.005		
Total	27.862	60			
Total corregida	2.506	59			

a. R cuadrado = .892 (R cuadrado corregida = .883)

PSP

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
Testigo	10	.2970		
M1_RI	10		.5564	
Fertilizado	10		.5948	
M5_SC	10			.7801
M1_GA	10			.8133
M4_RI	10			.8589
Sig.		1.000	.827	.144

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .005.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000

b. Alfa = .05.

Peso seco de raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSR

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.412 ^a	5	.082	9.189	.000
Intersección	10.688	1	10.688	1191.851	.000
Tratamiento	.412	5	.082	9.189	.000
Error	.484	54	.009		
Total	11.584	60			
Total corregida	.896	59			

a. R cuadrado = .460 (R cuadrado corregida = .410)

PSR

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
Testigo	10	.2824		
Fertilizado	10	.3564	.3564	
M1_RI	10		.4146	.4146
M5_SC	10		.4682	.4682
M1_GA	10		.4794	.4794
M4_RI	10			.5312
Sig.		.507	.057	.081

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .009.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = .05.

Contenido de clorofila

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Clorofila

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	483.561 ^a	5	96.712	5.253	.001
Intersección	50436.803	1	50436.803	2739.267	.000
Tratamiento	483.561	5	96.712	5.253	.001
Error	994.276	54	18.413		
Total	51914.640	60			
Total corregida	1477.837	59			

a. R cuadrado = .327 (R cuadrado corregida = .265)

Clorofila

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
Testigo	10	23.3200	
M1_GA	10	28.1900	28.1900
M4_RI	10		29.1500
M1_RI	10		30.0400
M5_SC	10		31.1300
Fertilizado	10		32.1300
Sig.		.131	.327

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 18.413.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000

b. Alfa = .05.

Micorrización

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Colonización

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1342.675 ^a	3	447.558	17.360	.000
Intersección	116964.225	1	116964.225	4536.916	.000
Aislamiento_MA	1342.675	3	447.558	17.360	.000
Error	928.100	36	25.781		
Total	119235.000	40			
Total corregida	2270.775	39			

a. R cuadrado = .591 (R cuadrado corregida = .557)

Colonización

DHS de Tukey^{a,b}

Aislamiento MA	N	Subconjunto	
		1	2
M5_SC	10	48.20	
M1_GA	10	50.50	
M1_RI	10	54.20	
M4_RI	10		63.40
Sig.		.056	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 25.781.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000

b. Alfa = .05.

ANEXO 3

Tablas estadísticas capítulo 3

Peso seco de planta

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.870 ^a	3	.290	69.938	.000
Intersección	5.283	1	5.283	1274.760	.000
Inoculación	.160	1	.160	38.625	.000
Saturación_H	.709	2	.355	85.594	.000
Error	.083	20	.004		
Total	6.235	24			
Total corregida	.952	23			

a. R cuadrado = .913 (R cuadrado corregida = .900)

PSP

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
H25NI	4	.2325			
H50NI	4	.3475	.3475		
H25I	4		.3675		
H50I	4		.4575	.4575	
CtrlNI	4			.5825	
CtrlI	4				.8275
Sig.		.110	.137	.070	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .003.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

b. Alfa = .05.

Peso seco de raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSR

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.255 ^a	3	.085	13.932	.000
Intersección	2.208	1	2.208	361.640	.000
Inoculación	.000	1	.000	.025	.877
Saturación_H	.255	2	.128	20.885	.000
Error	.122	20	.006		
Total	2.586	24			
Total corregida	.377	23			

a. R cuadrado = .676 (R cuadrado corregida = .628)

PSR

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
H25NI	4	.1500			
H50NI	4		.2275		
H25I	4		.2700		
CtrlI	4			.3475	
H50I	4			.3500	
CtrlNI	4				.5250
Sig.		1.000	.495	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .001.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

b. Alfa = .05.

Micorrización

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Micorrización

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	64.265 ^a	2	32.132	35.636	.000
Intersección	11721.250	1	11721.250	12999.298	.000
Tratamiento	64.265	2	32.132	35.636	.000
Error	8.115	9	.902		
Total	11793.630	12			
Total corregida	72.380	11			

a. R cuadrado = .888 (R cuadrado corregida = .863)

Micorrización

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
H25 I	4	29.0475	
Ctrl I	4	30.2625	
H50 I	4		34.4500
Sig.		.221	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .902.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

b. Alfa = .05.

Abundancia de arbúsculos

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: A

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	98.283 ^a	2	49.142	98.518	.000
Intersección	233.580	1	233.580	468.274	.000
Tratamiento	98.283	2	49.142	98.518	.000
Error	2.993	6	.499		
Total	334.857	9			
Total corregida	101.276	8			

a. R cuadrado = .970 (R cuadrado corregida = .961)

A

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
H25 I	3	1.6233		
Ctrl I	3		4.1200	
H50 I	3			9.5400
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .499.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Intensidad de la micorrización

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: M

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	49.828 ^a	2	24.914	72.553	.000
Intersección	537.467	1	537.467	1565.184	.000
Tratamiento	49.828	2	24.914	72.553	.000
Error	2.060	6	.343		
Total	589.355	9			
Total corregida	51.888	8			

a. R cuadrado = .960 (R cuadrado corregida = .947)

M

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
H25 I	3	5.0200		
Ctrl I	3		7.4067	
H50 I	3			10.7567
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .343.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

ANEXO 4

Tablas estadísticas capítulo 4

Peso seco planta

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.541 ^a	3	.180	27.112	.000
Intersección	10.787	1	10.787	1623.021	.000
Inoculación	.338	1	.338	50.922	.000
Plomo	.202	2	.101	15.207	.000
Error	.133	20	.007		
Total	11.461	24			
Total corregida	.673	23			

a. R cuadrado = .803 (R cuadrado corregida = .773)

BPA

DHS de Tukey.^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
Ctrl NI	4	.4175		
Pb100 N	4		.6050	
Pb200 N	4		.6325	
Pb100 I	4		.6825	
Ctrl I	4		.7300	
Pb200 I	4			.9550
Sig.		1.000	.051	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .003.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

b. Alfa = .05.

Peso seco raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSR

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.295 ^a	3	.098	13.375	.000
Intersección	6.365	1	6.365	866.286	.000
Inoculación	.045	1	.045	6.133	.022
Plomo	.250	2	.125	16.996	.000
Error	.147	20	.007		
Total	6.807	24			
Total corregida	.442	23			

a. R cuadrado = .667 (R cuadrado corregida = .617)

BR

DHS de Tukey.^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
Ctrl I	4	.3775	
Pb200 I	4	.3875	
Ctrl NI	4	.3900	
Pb100 NI	4		.6150
Pb100 I	4		.6500
Pb200 NI	4		.6700
Sig.		.998	.424

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .002.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

b. Alfa = .05.

Micorrización

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Micorrización

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.764 ^a	2	.382	.033	.968
Intersección	16741.017	1	16741.017	1438.260	.000
Tratamiento	.764	2	.382	.033	.968
Error	104.758	9	11.640		
Total	16846.539	12			
Total corregida	105.521	11			

a. R cuadrado = .007 (R cuadrado corregida = -.213)

Micorrización

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto
		1
Ctrl I	4	37.0975
Pb100 I	4	37.2600
Pb200 I	4	37.6950
Sig.		.967

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Basadas en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática(Error) = 11.640.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

b. Alfa = .05.

Abundancia de arbúsculos

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: A

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	216.210 ^a	2	108.105	169.668	.000
Intersección	377.525	1	377.525	592.516	.000
Tratamiento	216.210	2	108.105	169.668	.000
Error	3.823	6	.637		
Total	597.558	9			
Total corregida	220.033	8			

a. R cuadrado = .983 (R cuadrado corregida = .977)

A

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
Ctrl I	3	1.0033		
Pb100 I	3		5.5300	
Pb200 I	3			12.8967
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática(Error) = .637.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Intensidad de la micorrización

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: M

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	262.086 ^a	2	131.043	452.514	.000
Intersección	1177.176	1	1177.176	4064.991	.000
Tratamiento	262.086	2	131.043	452.514	.000
Error	1.738	6	.290		
Total	1441.000	9			
Total corregida	263.824	8			

a. R cuadrado = .993 (R cuadrado corregida = .991)

M

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
Ctrl I	3	3.8400	
Pb100 I	3		14.6033
Pb200 I	3		15.8667
Sig.		1.000	.064

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = .290.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

ANEXO 5

Tablas estadísticas capítulo 5

Peso seco de planta

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.301 ^a	3	.100	22.715	.000
Intersección	7.260	1	7.260	1644.239	.000
Inoculación	.213	1	.213	48.199	.000
Arsénico	.088	2	.044	9.974	.001
Error	.088	20	.004		
Total	7.649	24			
Total corregida	.389	23			

a. R cuadrado = .773 (R cuadrado corregida = .739)

BPA

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
As25 NI	4	.3725	
As15 NI	4	.4000	
Ctrl NI	4		.5950
As25 I	4		.6050
As15 I	4		.6575
Ctrl I	4		.6700
Sig.		.973	.365

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .003.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

b. Alfa = .05.

Peso seco de raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PSR

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.252 ^a	3	.084	20.302	.000
Intersección	4.664	1	4.664	1125.102	.000
Inoculación	.027	1	.027	6.433	.020
Arsénico	.226	2	.113	27.236	.000
Error	.083	20	.004		
Total	4.999	24			
Total corregida	.335	23			

a. R cuadrado = .753 (R cuadrado corregida = .716)

BR

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
As25 I	4	.3125		
As25 NI	4	.3475	.3475	
As15 I	4	.3650	.3650	
As15 NI	4		.4875	.4875
Ctrl I	4			.5450
Ctrl NI	4			.5875
Sig.		.849	.058	.279

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .004.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

b. Alfa = .05.

Micorrización

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Micorrización

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	82.811 ^a	2	41.405	6.978	.015
Intersección	13777.641	1	13777.641	2322.084	.000
Tratamientos	82.811	2	41.405	6.978	.015
Error	53.400	9	5.933		
Total	13913.851	12			
Total corregida	136.210	11			

a. R cuadrado = .608 (R cuadrado corregida = .521)

Micorrización

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamientos	N	Subconjunto	
		1	2
As25 I	4	30.2475	
Ctrl I	4	35.0450	35.0450
As15 I	4		36.3600
Sig.		.051	.733

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 5.933.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000

b. Alfa = .05.

Abundancia de arbúsculos

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: A

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	22.040 ^a	2	11.020	109.147	.000
Intersección	55.106	1	55.106	545.783	.000
Tratamiento	22.040	2	11.020	109.147	.000
Error	.606	6	.101		
Total	77.752	9			
Total corregida	22.646	8			

a. R cuadrado = .973 (R cuadrado corregida = .964)

A

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
Ctrl I	3	.9733		
As15 I	3		1.8167	
As25 I	3			4.6333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .101.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.

Intensidad de la micorrización

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: M

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	4.385 ^a	2	2.193	7.362	.024
Intersección	30.030	1	30.030	100.833	.000
Tratamiento	4.385	2	2.193	7.362	.024
Error	1.787	6	.298		
Total	36.203	9			
Total corregida	6.172	8			

a. R cuadrado = .710 (R cuadrado corregida = .614)

M

DHS de Tukey^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
As25 I	3	.9433	
As15 I	3	1.8867	1.8867
Ctrl I	3		2.6500
Sig.		.166	.276

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .298.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000

b. Alfa = .05.