



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Influencia de
Hongos Micorrícicos Arbusculares
y de *Azospirillum brasilense* y de
su interacción sobre el desarrollo de plántulas
de maguey (*Agave salmiana* var. *salmiana*)
en condiciones de invernadero**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JORGE EDUARDO SIMANCAS ORTIZ**

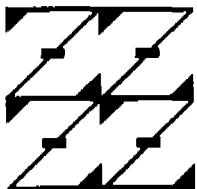
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
EN ECOLOGÍA VEGETAL**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARCADIO MONROY ATA

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2007

Investigación realizada con financiamiento de CONACYT (clave: SEMARNAT-2002-C01-668) y de la UNAM, a través de la DGAPA (Proyecto PAPIIT No. IN213706)





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

En primer lugar al planeta Tierra por brindar a todos los seres que la habitan ser parte de ella.

A mis padres, por apoyarme a lo largo de mi existencia en este plano.

Al Dr. Arcadio, no solo por haberme brindado la oportunidad de participar con el en este proyecto, sino también por brindarme su amistad.

A Maribel, por estar siempre pendiente y estar dispuesta a ayudar en lo que puede.

Al maestro Ramiro y Esther por brindarnos el apoyo en los análisis de suelo.

A la maestra Ma. de Jesús Sánchez Colín por su apoyo académico.

A Jacqueline por ser una buena amiga y estar conmigo en todo momento.

A Carlos (huevas) por las asesorías que me brindo.

Al Consejo General de Huelga de la UNAM (1999-2000) por no haber permitido que se privatizara la UNAM.

A todos los que han conformado en su momento al Grupo Estudiantil Revolucionario (GER27) que se ha caracterizado por ser crítico, propositivo y ser una alternativa dentro del *campus* universitario.

A mis padres y hermanos, por haberme apoyado en todo momento a lo largo de esta vida.

A la Misha por todas los momentos que compartimos.

A todos los seres y personas que han jugado en su momento un papel importante a lo largo de este proceso.

DEDICO ESTA INVESTIGACIÓN A:

*JOSE PATRICIO SIMANCAS VILLARREAL y a
JOSEFINA ORTIZ TOVAR, por su apoyo a lo largo
de todo este ciclo.*

*A la Misha, que ahora esta en un lugar
mejor, y que esta evolucionando.*

*A todo aquél lector interesado en adentrarse a temas
como los que aborda esta tesis.*

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1. Zonas aridas y semiáridas	3
3.2. Valle de Actopan	4
3.3. Las agaváceas	4
3.4. Micorrizas	8
Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)	
Ectomicorrizas	
Micorrizas de orquídeas	
Micorrizas ericales	
Factores que afectan la asociación micorrícica	
Efecto de los HMA sobre el crecimiento de las plantas	
Mejoramiento de la estructura del suelo	
3.5. <i>Azospirillum</i>	11
Distribución ecológica	
Eficiencia de los inóculos de <i>Azospirillum</i>	
3.6. Interacciones de hongos micorrizógenos arbusculares con microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre	14
3.7. Interacción de los HMA con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)	14
4. Justificación científica	16
5. Planteamiento del problema	17
6. Hipótesis	17
7. Objetivos	17
8. Metodología	18
8.1. Sitio de experimentación	18
8.2. Determinación de las propiedades físicas y químicas del sustrato	18
8.3. Pruebas de viabilidad y germinación	18
Viabilidad	
Germinación	
8.4. Propagación y evaluación del inóculo bacteriano	19
8.5. Inoculo de micorriza arbuscular	20
8.6. Análisis de <i>Azospirillum</i> en Santiago de Anaya, Hidalgo.	20
8.7. Inoculación bacteriana y de hongos micorrícicos arbusculares	21
8.8. Determinación del número de esporas de micorrizas arbusculares (MA) en el inóculo y evaluación bacteriana	21
Número de esporas de MA en el inóculo	
Evaluación de la inoculación bacteriana	
8.9. Porcentaje de supervivencia	21
8.10. Tasa de crecimiento relativo (TCR)	22
8.11. No de hojas	22
8.12. Riego	22
8.13. Determinaciones al final del experimento	22

8.13.1 Evapotranspiración real (ETR) y transpiración acumuladas	22
8.13.2. Cociente raíz-vástago (r/v)	23
8.13.3. Eficiencia en el uso del agua (WUE)	23
8.13.4. Potencial hídrico	23
8.13.5. Porcentaje de colonización micorrícica	24
8.13.6. Número de unidades formadoras de células (UFC)	24
9. Trabajo de gabinete	25
Diseño experimental	
Análisis estadístico	
10. Diagrama de flujo de la metodología	26
11. Resultados y discusión	27
11.1. Análisis del sustrato utilizado en el experimento	27
11.2. Pruebas de viabilidad y germinación	28
Viabilidad	
Germinación	
11.3. Análisis de <i>Azospirillum</i> en el lugar de recolecta de las semillas utilizadas en el experimento	30
11.4. Determinación del número de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en el inóculo y evaluación bacteriana	31
Número de esporas de HMA en el inóculo	
Concentración del inóculo bacteriano utilizado	
Evaluación bacteriana	
11.5. Porcentaje de supervivencia de plántulas de <i>Agave salmiana</i>	32
11.6. Tasa de crecimiento (TCR)	32
11.7. Análisis de altura, cobertura máxima, mínima, y número de hojas	33
11.8. Determinaciones al final del experimento	34
Evapotranspiración real (ETR) y Transpiración acumulada	
Cociente raíz/vástago y uso eficiente del agua	
Potencial hídrico	
Contenido de fósforo y nitrógeno en suelo	
Contenido de fósforo y nitrógeno en tejido vegetal	
Porcentaje de colonización micorrícica	
Número de unidades formadoras de células (UFC)	
12. Tabla de resultados	41
13. Análisis general de resultados	42
14. Conclusiones	43
15. Recomendaciones	43
16. Referencias	44
17. Anexos	48
17.1. Anexo 1	48
Métodos empleados para la determinación de las propiedades físicas del suelo	
17.2. Anexo 2	48
Métodos empleados para la determinación de las propiedades químicas del suelo	
17.3. Anexo 3	48
Método de Olsen, para fósforo extraíble	

17.4. Anexo 4	51
Método Kjeldhal, nitrógeno total	
18. Apéndice	53

ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y GRÁFICOS

Fig. 1. Vista satelital de los Estados Unidos Mexicanos	3
Cuadro 1. Agaváceas del mundo y de México	5
Cuadro 2. Clasificación actual de los HMA	11
Cuadro 3. Caracterización física del suelo	27
Cuadro 4. Caracterización química del suelo	27
Cuadro 5. Viabilidad de semillas de <i>Agave salmiana</i> por lote	28
Cuadro 6. Análisis de <i>Azospirillum</i> en el lugar de recolecta de las semillas utilizadas en el experimento	30
Cuadro 7. Porcentaje de supervivencia de de plántulas de maguey para los diferentes tratamientos	32
Cuadro 8. Promedios de tasa de crecimiento relativo para los diversos tratamientos suministrados a las plántulas de <i>Agave salmiana</i>	32
Cuadro 9. Promedios de altura, cobertura máxima, mínima y número de hojas	33
Cuadro 10. Promedios de peso fresco y seco en gramos de las plántulas de <i>Agave salmiana</i> entre los diferentes tratamientos, así como el cociente biomasa radical/biomasa del vástago y la eficiencia en el uso del agua (WUE) correspondientes	35
Cuadro 11. Promedio de los valores obtenidos en la cuantificación de nitrógeno y fósforo en suelo	37
Cuadro 12. Promedios de los valores obtenidos en la cuantificación de nitrógeno y fósforo en tejido vegetal de plántulas de <i>Agave salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	38
Cuadro 13. Porcentajes de colonización micorrícica y número de Unidades Formadoras de Células (UFC) para los diversos tratamientos	39
Gráfico 1. Germinación de semillas de <i>Agave salmiana</i> en cámara de germinación a 30°C	29
Gráfico 2. Germinación de semillas de <i>Agave salmiana</i> en condiciones de invernadero	29
Gráfico 3. Evapotranspiración semanal acumulada	34

Gráfico 4. Evapotranspiración acumulada total	34
Gráfico 5. Transpiración semanal	34
Gráfico 6. Transpiración semanal acumulada	34
Gráfico 7. Transpiración acumulada total	34
Gráfico 8. Promedios de potencial hídrico para los tratamientos y el Testigo	36

1. RESUMEN

Las regiones áridas y semiáridas del planeta están localizadas entre las latitudes 25° y 35° de ambos hemisferios; en México, estas zonas ocupan alrededor del 60% de su superficie. Sin embargo, actividades de origen humano como sobrepastoreo, uso indiscriminado de fertilizantes, destrucción de hábitats naturales por cambio de uso de suelo, entre otros factores, han propiciado que estos ecosistemas y muchos otros se deterioren. Dado lo anterior, ha surgido la necesidad de realizar proyectos de restauración ecológica que puedan revertir el creciente deterioro de los ecosistemas. Así también, es sabido que el uso de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y de bacterias fijadoras de nitrógeno y/o promotoras del crecimiento vegetal, pueden ayudar al establecimiento de las plantas promoviendo una colonización vegetal más exitosa en el medio donde se desarrolla. Los efectos que producen estos microorganismos en plántulas de maguey (*Agave salmiana* var. *salmiana*) han sido poco estudiados, a pesar de que esta especie tiene un amplio rango de distribución y juega un papel importante en el ecosistema donde pertenece, ya que además de actuar como planta nodriza, tiene valor comercial y medicinal entre otros usos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y *Azospirillum brasilense* CD (Ab) en plántulas de maguey bajo condiciones de invernadero. Se consideró un testigo y tres tratamientos:

1) inoculación con HMA, 2) inoculación con Ab, 3) inoculación con HMA+Ab. Las plantas fueron cultivadas en un sustrato que consistió en una mezcla de suelo-arena sílica en una proporción 1:1 (v/v) y regadas a capacidad de campo con agua destilada durante 8 meses. Tanto las semillas del maguey, el suelo utilizado en el experimento, como los HMA provienen del Valle de Actopan, Hidalgo. La cepa bacteriana fue obtenida por donación del Instituto de Fijación del Nitrógeno de la UNAM. Asimismo, se cuantificaron parámetros edáficos tales como: pH, materia orgánica, textura, densidad aparente y real, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, nitrógeno y fósforo asimilables antes de iniciar el cultivo y después de la cosecha de las plántulas. También se registró la tasa de crecimiento relativo, altura, cobertura máxima y mínima, número de hojas, evapotranspiración (ETR) y transpiración acumuladas, porcentaje de colonización micorrícica, número de unidades formadoras de células (UFC) por 0.1 g de raíz, biomasa húmeda y seca, coeficiente raíz/vástago, potencial hídrico foliar, eficiencia en el uso del agua (WUE), porcentaje de nitrógeno y fósforo en tejido vegetal fueron las variables de respuesta registradas y/o cuantificadas.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento HMA+Ab obtuvo diferencias estadísticamente significativas por arriba de los otros tratamientos y el Testigo para los parámetros de número de hojas, colonización micorrícica, número de UFC y potencial hídrico. Así también los tres tratamientos (HMA, Ab y HMA+Ab) tuvieron diferencias significativas sobre el Testigo en la concentración de fósforo en tejido radical. Aunque estrictamente estas diferencias encontradas no son atribuibles solamente a los inóculos, ya que dado que la planta es de ciclo de vida largo (ca. 20 años) y que el tiempo de duración del experimento fue corto (8 meses), es probable que la plasticidad vegetal de la especie haya jugado también un papel importante en estas diferencias. La doble inoculación puede aprovecharse para programas de restauración ecológica, con una mayor probabilidad de éxito en el establecimiento de las plantas.

2. INTRODUCCIÓN

La creciente degradación del suelo causada por actividades humanas trae consigo la disminución de su fertilidad y el deterioro de sus propiedades físicas y biológicas (Siqueira *et al.*, 1998) provocando así una baja en la productividad ganadera, agrícola y forestal.

Por ello, se han empezado a buscar formas de recuperación de suelos, teniendo entre otras alternativas la restauración ecológica (Montaño y Monroy, 1999) la cual se define como la acción de reconstruir un ecosistema para reestablecer la condición original del sitio (Lamb *et al.* 1997). De esta manera, el uso de inóculos en el repoblamiento vegetal, puede ayudar a dicho propósito. Así en este estudio se probaron tres tipos de inóculos los cuales se citan a continuación:

1. Inóculo de Hongos Micorrízogenos Arbusculares (HMA)
2. Inóculo de *Azospirillum brasilense* (Ab)
3. Inóculo de HMA/*Azospirillum brasilense* (HMA+Ab)

La especie en la que se evaluó la eficiencia de los inóculos es el maguey (*Agave salmiana* var. *salmiana*), debido a las características de esta especie, ya que le permiten por un lado actuar como una planta nodriza que crea a su alrededor un microhábitat que puede sustentar el establecimiento de otras especies, y por ende un incremento en la cubierta vegetal que favorezca el proceso de sucesión ecológica, teniendo como consecuencia la rehabilitación del lugar en un menor tiempo y costo; por otro lado, esta planta trae beneficios económicos y nutrimentales a la población, ya que, puede ser consumida por el ganado, se le pueden extraer algunos tipos de fibras, además de producir algunas bebidas como el agua miel que es altamente benéfico para el ser humano por su alto contenido de glúcidos y proteínas.

Cabe señalar que la estabilidad del sistema suelo-planta depende no sólo de la raíz, sino también de la microbiota asociada, la cual afecta la eficiencia en la captación de nutrimentos y la química del medio (pH, potencial redox). Por esta razón, la productividad vegetal y el reciclaje de nutrimentos están influenciados por las poblaciones microbianas rizosféricas (Barea y Jeffries, 1995)

Se sabe que cuando las micorrizas arbusculares y las bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentran en condiciones favorables, la interacción entre estos dos grupos es sinérgica y se obtienen incrementos significativos en el crecimiento y contenido de fósforo en la planta, además de que la bacteria promueve la colonización por la micorriza (Bashan *et al.*, 1996). Así también es sabido que la micorriza arbuscular y las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre son dos grupos que participan en la descontaminación de suelos.

3. Marco teórico

3.1. Zonas áridas y semiáridas

La mayoría de las regiones áridas y semiáridas del mundo están localizadas entre las latitudes 25° y 35°, donde la alta presión causa que el aire caliente descienda, resultando en masas de aire seco estable. La aridez orográfica es común en Norte y Sur América, donde las cadenas montañosas se extienden perpendicularmente haciendo que prevalezca el movimiento de las masas de aire que a su vez son enfriadas por las montañas. Esto reduce su capacidad de retener agua, y la mayoría de la humedad es depositada en altas elevaciones de las laderas contra las que choca el viento. Entonces ahora las masas de aire relativamente seco se calientan conforme descienden en el sotavento de la cadena montañosa, incrementando su capacidad de retención de agua y reduciendo la probabilidad de que haya precipitación alguna. A este tipo de aridez orográfica se le conoce como efecto de sombra de lluvia (Skukins, 1991).

Las propiedades físicas para varias regiones de suelo árido y semiárido incluye alta erodibilidad, susceptibilidad a sellarse y encostrarse en su formación, poca capacidad de retención de agua, perfil de endurecimiento, inestabilidad en la estructura, bajo contenido y actividad de las arcillas, y altas temperaturas de la superficie en los meses de verano. Sin embargo, es necesario ser precavidos al hacer generalizaciones acerca de los suelos que se encuentran a lo largo del globo terráqueo, ya que existe un vasto arreglo de combinaciones de los factores formadores de suelo.

Algunas propiedades químicas comunes, tales como bajo contenido de materia orgánica y la presencia de sales, especialmente Na, resulta en una pobre estabilidad de agregados y conlleva a problemas comunes en las regiones con suelos áridos, tales como alta erosión por agua y viento y alta predisposición a encostramientos.

En la figura 1 se pueden apreciar las zonas áridas y semiáridas de México y parte de Estados Unidos de color café, además se puede observar cómo estas áreas, en su mayoría se encuentran delimitadas por la Sierra Madre Oriental y Occidental, que producen el llamado efecto de sombra de lluvia.



Fig. 1. Vista satelital de los Estados Unidos Mexicanos.

3.2. Valle de Actopan

Las fotos 1 y 2 muestran parte del Valle de Actopan, Estado de Hidalgo. El Valle se localiza entre los 20° 21' y 20° 25' de latitud norte y entre los 98° 11' y 98° 54' de longitud oeste, con una altura promedio de 1950 m.

Según la clasificación de Köppen modificada por García (1981) cuenta con un clima BSk(w''w(i)g' con régimen de lluvias de verano, con un periodo de sequía intraestival, una precipitación media anual de 550 mm concentrada en los meses de junio a septiembre según la clasificación de Köpen y con una temperatura media anual de 16 °C.

El Valle de Actopan es una cuenca de origen lacustre que ocupa las depresiones que se han formado entre el relieve montañoso de la Sierra de Pachuca. Las rocas que afloran en el Valle corresponden al Mesozoico, sobre las cuales sobreyacen rocas volcánicas del Terciario (aluviones y conglomerados), que constituyen el material parental de los suelos. Los suelos son someros, de color grisáceo, que descansan sobre piedra caliza que cubre la toba volcánica. Esta caliza es de difícil fragmentación por procesos naturales; su origen se remonta a la sedimentación de los minerales contenidos en las aguas que antiguamente cubrían esta región. El componente principal de esta capa es el carbonato de calcio. El factor limitante para el crecimiento de las plantas es el espesor del suelo, ya que el 45% de la superficie tiene espesores menores a los 60 cm de profundidad. El tipo de vegetación es de matorral espinoso con elementos de matorral espinoso crasicalescente (Rzedowski, 1994).



Foto 1. Agostadero semiárido con *Opuntia streptacantha* y *A. salmiana* en primer plano.



Foto 2. Matorral xerófilo y ejemplar de *A. salmiana* al centro.

3.3. Las agaváceas

Los miembros de la familia Agavaceae presentan ciclos de vida contrastantes, ya que los individuos de algunas especies lo hacen anualmente, mientras que otros sólo emiten una inflorescencia en su vida para después morir. Este último es el caso de la planta bajo estudio (*Agave salmiana* var. *salmiana*).

Los agaves o magueyes como se les conoce comúnmente, junto con las yucas o izotes y los amoles pertenecen a la familia Agavaceae, mientras que los sotoles, cucharillas y palmillas pertenecen a la familia Nolinaceae (antiguamente considerada dentro de las Agavaceae). Ambas familias representan un grupo de plantas suculentas típicas de las zonas semiáridas de México, con gran importancia biológica, ecológica y económica (García, 1992., citado por Granados, 1993).

La familia Agavaceae está formada por los géneros *Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Hesperaloë*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyanthes* y *Yucca*, mientras que la familia Nolinaceae la constituyen los géneros *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Dasyilirion* y *Nolina* (García, 1992., citado por Granados, 1993). El género *Agave*, agrupa dos subgéneros: *Agave* y *Littaea*. La diferencia entre ambos se encuentra en la inflorescencia, ya que en *Agave*, éstas son en forma de racimos y sus flores están agrupadas; mientras que en *Littaea* tiene forma de espiga y las flores se encuentran en pares (Granados, 1993).

Las agaváceas son muy tolerantes a climas áridos y suelos arenosos y rocosos, pueden crecer cerca de la costa y hasta los 3000 metros. Tienen una gran funcionalidad para soportar periodos prolongados de sequía, como son el control de la transpiración y las reservas de agua en sus tejidos foliares y radicales (Granados, 1993). Es por ello que se les encuentran dentro del grupo de plantas denominadas CAM ya que pueden evitar daños fisiológicos (reducción en la eficiencia del fotosistema II, deterioro del metabolismo de las proteínas y la síntesis de aminoácidos), causados por la sequía a través de un mecanismo denominado retraso en la desecación (Tyree *et al.*, 2002., citado por Pimienta, 2006). Este se expresa mediante la asimilación nocturna de CO₂, cutículas gruesas, baja frecuencia de estomas y succulencia., esta última permite el movimiento continuo del agua almacenada del parénquima medular al clorénquima durante la estación seca del año, cuando se reduce el contenido de agua en el suelo (Nobel, 1995., Lüttge, 2004., Pimienta-Barrios *et al.*, 2005., citados por Pimienta, 2006).

México es el centro de origen de la familia Agavaceae. De las 288 especies descritas de esta familia, que se distribuye en el continente americano –desde Dakota del Norte, EUA, hasta Bolivia y Paraguay– en México se encuentra la mayor diversidad con 217 especies, de las cuales 151 son endémicas. Los estados más ricos en número de especies son Oaxaca, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango y Jalisco.

Cuadro 1.
Agaváceas del mundo y de México

AGAVACEAE

GENEROS	TOTAL DE ESPECIES	ESPECIES EN MÉXICO
<i>Agave</i>	166	125 (75%)
<i>Beschorneria</i>	7	7 (100%)
<i>Furcraea</i>	20	11 (55%)
<i>Hesperaloë</i>	3	3 (100%)
<i>Manfreda</i>	28	27 (96%)
<i>Polianthes</i>	13	13 (100%)
<i>Polianthes</i>	1	1 (100%)
<i>Yucca</i>	50	30 (60%)
TOTAL	288	217 (75%)

Tabla tomada de (García, 1992., citado por Granados, 1993).

Fotos de especies de géneros pertenecientes a la familia *Agavaceae*





Foto 3. *Agave lechuguilla*

Foto 4. *Beschorneria bracteata*



Foto 5. *Furcraea selloa*



Foto 6. *Hesperaloe parviflora*



Foto 7. *Manfreda maculosa*



Foto 8. *Polianthes tuberosa*



Foto 9. *Yucca decipiens*

Las agaváceas y nolináceas son plantas con hojas agrupadas en roseta al final de un tallo aéreo o bien estar enterrado en el suelo y en este caso la roseta se observa directamente sobre el piso o rocas. Las hojas almacenan agua y presentan diferentes grados de succulencia, siendo menor en las especies herbáceas. El margen de la hoja puede presentar dientes de diferentes tamaños, que nacen sobre protuberancias llamadas mamilas, o bien tener dienteillos, o ser liso; en ocasiones el margen se deshace en fibras de diferente grosor. En el ápice de la hoja se puede presentar una espina fuerte en los géneros *Agave* y *Yucca*, mientras que, en los otros géneros se reduce o desaparece. La variación en la forma de la hoja, su tamaño y tipo de margen es importante para

reconocer especies. Una vez que la planta madura se inicia el desarrollo de su inflorescencia, que por lo general es desproporcionada respecto al tamaño de la planta, con esta etapa se inicia la reproducción sexual, que culmina con la apertura de las flores, las cuales son de color amarillo, blanco, naranja, rojo o verde. La polinización se lleva a cabo en este momento e intervienen ciertos animales como murciélagos, colibríes y diversos insectos, principalmente polillas nocturnas. La reproducción puede ser también de tipo asexual, ya sea mediante la emisión de hijuelos que nacen alrededor de la planta madre, entre las hojas, o bien al lado de los frutos, y en este caso reciben el nombre de bulbilos (García, 1992., citado por Granados, 1993).

La palabra maguey parece ser de origen antillano, derivada posiblemente de las palabras maguey, magheih, magney o mangueis y fue traída por los españoles durante la conquista. Los Nahuas conocen a los magueyes con el nombre genérico de *metl*; los otomíes como *uadá* o *bomi'ni*, los zapotecos como *dua* o *doba*, los mixtecos como *yabi* y los purépechas como *tacamba*. En 1753 Linneo designó con el nombre genérico de *Agave* a este tipo de plantas. La palabra proviene de una raíz griega que significa "admirable" y describe no solo su rara apariencia, sino también su gran longevidad y su floración.

Durante el florecimiento de las culturas mesoamericanas, las agaváceas jugaron un papel importante, proporcionando al ser humano alimento, calor, techo, vestido, medicina, bebida, uso religioso, ornato, muebles, implementos agrícolas, forrajes y otros usos diversos.

En la actualidad aún se señalan más de 70 formas de empleo, siendo las principales, la obtención de bebidas fermentadas (pulque), bebidas destiladas (tequila y mezcal) y la obtención de fibras largas y cortas de numerosas especies (como el henequén, la lechuguilla y el espadín). A menor escala se usan en la construcción, como alimento, ornato, medicina y para la elaboración de artículos domésticos diversos (García, 1992., citado por Granados, 1993).

Sinonimia: *Agave salmiana* var. *salmiana*

Agave jacobiana Salm-Dyck

Agave tehuacanensis Karw. ex Salm-Dyck

Agave mitriformis Jacobi

Agave lehmannii Jacobi

Agave cochlearis Jacobi

Agave quiotifera Trel. ex Ochot.

Agave compluviata Trel.

Agave atrovirens Karw. ex Salm-Dyck var. *sigmatophylla* A. Berger

Nombre común: Maguey.

- ❖ Descripción: Plantas de tamaño medio a grande, con gruesos tallos cortos, suculentas, formando rosetas masivas, de 1.5-2 m de alto y frecuentemente el doble de ancho, hojas de 1-2 m de largo, 20-35 cm de ancho; muy gruesas en la base, verdes a glaucogrisáceas, el ápice acuminado algo sigmoidal curvo (hacia afuera); margen repando, algunas veces mamilado; dientes grandes cerca de la mitad de la lámina, de 5-10 mm de largo, de 3-5 cm apartados unos de otros; espina terminal robusta, subulada, de 5-10 cm de largo, largamente decurrente; inflorescencia robusta, de 7-8 m de alto, el pedúnculo cubierto con brácteas imbricadas carnosas; panícula amplia, con 15-20 umbelas grandes; flores de 8-11 cm de largo, gruesas-carnosas, amarillas; ovario verde, de 5-6 cm de largo; tubo funelforme, de 21-24 mm de profundidad, 20 mm de ancho; lóbulos desiguales, rizados hacia el interior en la antesis, los externos de 21-25 mm de largo, los internos de 2-3mm, con una quilla carnosa; fruto de 5.5-7 cm de largo, cerca de 2 cm de diámetro; semillas de 8 a 9 mm de largo, de 6 a 7 mm de diámetro, lacrimiformes, negras. Tiene 30 cromosomas, 5 largos y 25 pequeños.
Agave salmiana florece únicamente cuando cumple los 15 años de edad o más, el pedículo de las flores es enorme (15 a 40 pies) empezando como un espárrago, pero las flores son inconspicuas.

- ❖ Hábitat: Especie de hábito terrestre en asociación con múltiples plantas leñosas como mezquites, acacias y encinos a una altitud de 1875m, con pino a una altitud de 2700 m.
- ❖ Usos de *Agave salmiana* var. *salmiana*:

Bebidas y licores: El jugo llamado “aguamiel” es utilizado para elaborar el pulque.

Forrajero: Las pencas son consumidas por el ganado.

Medicinal: El “agua miel” se usa para curar las inflamaciones, también se dice lo mismo del pulque que sirve para vigorizar la sangre.

Comercialización: La planta se vende en pie. En Hidalgo y Puebla existía una gran producción de pulque que ha disminuido debido a las bebidas embotelladas. También el consumo de fibras ha mermado por la introducción de fibras sintéticas. El precio del litro de pulque es de \$9.00 a \$12.00 según la calidad del producto y del área donde se venda. Esta bebida se comercializa frecuentemente de casa en casa, en tianguis y pulquerías.

Las siguientes fotos muestran a *Agave salmiana* var. *salmiana* y su inflorescencia:



Foto 10. *Agave salmiana* var. *salmiana*



Foto 11. Inflorescencia de *Agave*

3.4. Micorrizas

Existen datos que indican que los hongos fueron los primeros organismos eucarióticos que salieron de las aguas, donde se origino la vida (Ruiz Herrera, 2001., citado por Marquez 2002). Hace unos 400 millones de años las plantas comenzaron a colonizar la superficie terrestre. (Azcon *et al.*, 1980). El transito de estas desde su hábitat acuático a ambientes secos, y la evolución en ellos a plantas con raíces, antecesoras de las actuales plantas superiores; fue en efecto un punto crucial en la historia de la vida sobre la Tierra. Cuando la vida era únicamente acuática los vegetales podían utilizar directamente los minerales disueltos en el agua y encontraban recursos casi inagotables, pero al comenzar a colonizar la tierra encontraron condiciones totalmente distintas. En los suelos procedentes de la degradación de las rocas, los elementos minerales se encuentran básicamente en forma insoluble. Su concentración es

extremadamente pequeña en las soluciones del suelo. Los intercambios entre las formas solubles e insolubles son lentos. Por tanto las soluciones del suelo se agotan rápidamente por la extracción que los vegetales llevan a cabo. Las primeras plantas terrestres tuvieron que adaptarse a estas condiciones tan especiales. Solamente las que pudieron asociarse a hongos consiguieron colonizar los continentes (Le Tacon, 1985).

La micorriza es una asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas superiores (tanto cultivadas como silvestres) y ciertos hongos del suelo. En este tipo de asociación la planta recibe recursos de la tierra (nutrimentos minerales y agua), mientras que los hongos reciben compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis (Harley, 1989). Las micorrizas son componentes inseparables del ecosistema del suelo y son importantes en la nutrición de la planta en el ciclo de nutrimentos y en el desarrollo de la estructura del suelo.

La palabra micorriza significa “hongo-raíz” (del griego *myces*: hongo y *rhiza*: raíz) (Le Tacon, 1985).

Las micorrizas desarrollan una red de filamentos en torno a las raíces, lo que amplía considerablemente la superficie de contacto entre las raíces y las soluciones y/o partículas del suelo (Le Tacon, 1985).

De las 60, 000 especies de hongos conocidos aproximadamente 5, 000 tienen carpóforos (órgano de reproducción del hongo) y están asociados a árboles forestales en las regiones boreales y templadas (Le Tacon, 1985).

- Tradicionalmente se reconocen cuatro tipos de micorrizas:

a) Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA): usualmente predominan en los prados, sistemas de agricultura, biomas áridos y semiáridos, algunos tipos de bosques, huertos y bosques tropicales (Brundrett, 2004). Los hongos formadores de micorrizas arbusculares pertenecen al phylum Glomeromycota. La micorriza arbuscular es la más antigua que se conoce, probablemente se origino hace 350 a 460 millones de años y se considera fue importante en la colonización del ambiente terrestre por las plantas (Varela y Trejo, 2001). La simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo, tras la emisión del tubo germinativo, el micelio del hongo crece hasta encontrar una raíz hospedera, donde forma entonces una estructura similar a un apresorio y penetra entre las células epidérmicas o a través de los pelos radicales. Después de la penetración comienza la colonización del tejido parenquimático de la raíz. En la capa interna de este tejido se forman los arbusculos (estructuras responsables de la transferencia bidireccional de nutrimentos entre los simbioses, realizada en la interfase planta-hongo producida a este nivel producidos por una ramificación masiva de la hifa después de invaginar la pared celular. La hifa se encuentra rodeada por la membrana plasmática de las células del parénquima cortical, siendo el espacio apoplástico producido entre la membrana plasmática y el hongo la zona de intercambio de nutrimentos. La vida de los arbusculos es muy corta, inferior a 15 días. Las vesículas se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado; suelen aparecer más tarde que los arbusculos y son consideradas órganos de reserva, principalmente de lípidos (Beilby y Kidby, 1980). La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas exteriores por la superficie de la raíz y penetrar en ésta a intervalos irregulares (Sieverding, 1991., citado por Arroyo, 1998). Cuando la infección interna esta bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces; con ello la planta aumenta considerablemente su superficie de absorción, de 100 a 1000 veces (Gil, 1995), y por tanto su capacidad de captación de nutrimentos y de agua. Las esporas de resistencia pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo se colapsan tras una permanencia en suelo de 2 a 4 semanas si no encuentran una raíz hospedera (Bolan y Abbott, 1983., citado por Cordoba, 1999).

b) Ectomicorrizas: tienden a aparecer en bosques. Se caracteriza por una modificación de la raíz, que pierde sus pelos absorbentes. El hongo rodea la raíz con un manto de filamentos, o micelio del cual parte una red miceliar externa, mas o menos desarrollada, que se extiende por el suelo, y una red miceliar interna que penetra en la raíz, pero sin entrar en el interior de las células.

c) Micorrizas de orquídeas: las Orquídeas dependen en al menos una parte de su ciclo de vida de la asociación micorrícica para poder ser proveídas de su suplemento de carbón y energía. En su ambiente natural son obligatoriamente micorrizadas y cuestionan los resultados de la inoculación inducida que estimula el crecimiento u otros posibles beneficios que pudieran ser no relevantes. Sin embargo, es posible que la simbiosis sea benéfica para las orquídeas de otra manera, por ejemplo, en su nutrición mineral o en el proveimiento de sustancias de crecimiento y/o vitaminas. Por otro lado, se sabe que la asociación micorrícica les es necesaria para la germinación y su desarrollo como adultos (Brundrett, 2002)

d) Micorrizas ericales: son comunes en hábitats donde crecen plantas de la familia Ericaceae, tales como pantanos y ecosistemas boreales. No se sabe a ciencia cierta, si los hongos micorrícicos ericoides existen originalmente como saprófitos del suelo o como asociaciones micorrícicas de plantas. Si son menos dependientes de las plantas que los hongos MA y ECM, su capacidad para formar asociaciones micorrízicas no debería ser un factor que maneje su evolución. Las asociaciones de micorrizas ericales se han considerado para desintoxicar suelos altamente ácidos y para la adquisición de nutrientes orgánicos (Smith y Read, 1997., Brundrett, 2002). Sustancias benéficas nutricionales han sido demostradas en algunos experimentos, pero no en todos, por lo que puede ser una asociación facultativa. Miembros de ericales con micorrizas monotropoides o arbustoides, generalmente tienen mayor especificidad que otras asociaciones ectomicorrícicas (Brundret., 2002).

Alrededor del 90% de las especies de plantas probablemente forman micorrizas (Alarcón *et al.*, 2000).

Las ectomicorrizas y micorrizas arbusculares son las dos más significantes ecológicamente siendo esta última la que ocurre en las dos terceras partes de las especies de plantas.

Factores que afectan la asociación micorrícica

Se puede considerar que los factores que afectan a la raíz son los mismos que inciden en la micorriza, entre otros, el potencial fotosintético, la fertilidad del suelo y la intensidad luminosa elevada. En un principio las pequeñas raíces, a pesar de que contienen pocos azúcares simples, crecen rápidamente debido a la fertilidad del suelo y a la presencia de la micorriza que las protege del ataque de patógenos. A su vez, el crecimiento del hongo simbiote está regulado por la temperatura, el pH, la humedad extrema y la presencia de ciertos organismos antagónicos en áreas cercanas a la raíz. Los hongos micorrícicos no pueden crecer y reproducirse en el suelo a menos que estén asociados simbióticamente con las raíces de las plantas, aunque pueden sobrevivir en estado latente sin el hospedero (Cruz-Ulloa, 1995., citado por Cruz-Ulloa, 1999).

Efecto de las micorrizas arbusculares sobre el crecimiento de las plantas

Las micorrizas incrementan la absorción de nutrimentos minerales del suelo, que se traduce en un mayor crecimiento y desarrollo de las mismas. La expansión del micelio externo del hongo por el suelo rizosférico es la causa principal de este efecto, permitiendo la captación de nutrimentos más allá de la zona de agotamiento que se crea alrededor de las raíces, por la propia absorción de la planta (Sanders y Tinker, 1973., citado por Varela, 1999).

El papel de la simbiosis es fundamental en la captación de elementos minerales de lenta difusión en los suelos, como los fosfatos solubles, el Zn y el Cu. La absorción de nitrógeno también se

favorece con la micorrización (Barea y Azcón-Aguilar, 1984). Otros elementos como el potasio y el Magnesio se encuentran a menudo en concentraciones más altas en las plantas micorrizadas (Sieverding, 1991., citado por Arroyo, 1998). La absorción del calcio es estimulada también con la simbiosis micorriza arbuscular (Plenchette, 1983). Por lo que respecta a los micronutrientes Zn, Cu y Bo, éstos son activamente absorbidos por las hifas del hongo y transportados hasta el hospedador (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1983).

Existen otros efectos producidos por la micorriza arbuscular entre los que destacan un aumento de la resistencia de la planta al estrés hídrico y a la salinidad, un aumento de la resistencia y/o tolerancia a determinados patógenos del suelo, un incremento de la supervivencia al trasplante y un incremento de la fijación del nitrógeno en leguminosas (Linderman, 1992).

En las plantas micorrizadas se produce un aumento del contenido de agua, debido a un aumento de la conductividad hídrica de la planta o a una disminución de la resistencia al flujo de agua a través de ella. También puede ser debido a una mayor absorción a través de la extensa red de hifas externas del hongo micorrízico arbuscular, extendidas más allá de la zona a la cual tiene acceso directo el sistema radical. La planta hace un mejor uso del agua y es capaz de recuperarse más rápidamente en caso de estrés hídrico (Cooper, 1984).



Foto 12. Espora de HMA (García, 2007)

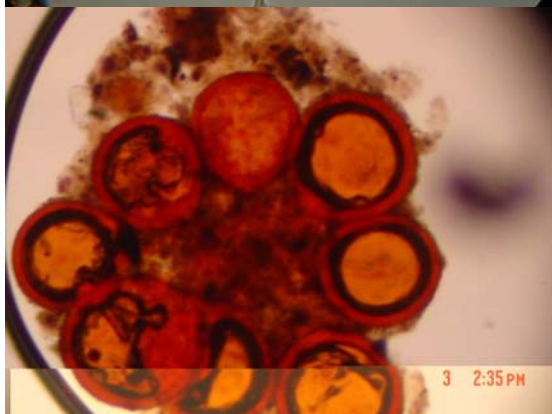


Foto 13. Esporocarpio de *Glomus* sp. (García, 2007)

Mejoramiento de la estructura del suelo

Todos los HMA pertenecen al orden glomales, los cuales producen glomalina (una proteína que contribuye a la formación de agregados de partículas de suelo por donde puede desplazarse agua, aire, animales como lombrices y las raíces de las plantas). Además los hongos micorrízicos favorecen la formación de un mayor número de poros, lo cual da como resultado una buena aireación del suelo.

La importancia de los hongos micorrízicos arbusculares en la fertilidad del suelo esta fuera de duda (Jeffries y Barea, 1994., citados por Estaún, 1997). Las micorrizas arbusculares son

componentes llave en el ciclo de nutrientes y representan un puente entre las porciones inorgánicas y bióticas del sistema del suelo. Disturbios en el suelo reducen las poblaciones de los hongos micorrícicos (Habte, 1989., citado por Estaún, 1997) y por consiguiente pueden traer efectos negativos en la vegetación.

Cuadro 2. Clasificación actual de los HMA (Schüssler, 2004., citado por Castillo, 2005)

Reino	División	Clase	Orden	Familia	Género
Fungi	Glomeromycota	Glomeromycetes	Archaeosporales	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>
				Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
			Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>
					<i>Entrophospora</i>
				Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>
				Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i>
					<i>Scutellospora</i>
				Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
				Glomeraceae	<i>Glomus</i>
			Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>

3.5. *Azospirillum*

Se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociativas que fijan N₂, pero sólo algunas destacan por su potencial como biofertilizantes o promotoras de crecimiento vegetal destacando entre estas las siguientes:

Aerobias: *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia* y *Azospirillum*; aerobias facultativas: *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*; anaerobias: *Metanobacterium*, *Clostridium* y *Desulfovibrio* (Beringer, 1984; Ferrera Cerrato, 1995., citado por Cordoba Cano, 1999).

Las bacterias del género *Azospirillum* (subclase- α de protobacteria) son conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta. Fueron aisladas de la rizosfera de varios pastos y cereales a lo largo de todo el mundo, tanto en climas templados como tropicales. Han sido descritas hasta el momento 5 especies: *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum halopraeferens* y *Azospirillum irakense* (Bashan y Levanony, 1990., citado por Sanchez Colín, 2000)

Azospirillum deriva del sustantivo francés **azote**, nitrógeno, y del griego **spira** una espiral; **spillum** – una espiral pequeña, por lo que su nombre significa una pequeña espiral de nitrógeno. La movilidad le ofrece a esta bacteria la ventaja de moverse a regiones donde las condiciones nutrimentales le sean favorables. *Azospirillum* muestra una versatilidad en la movilidad en el metabolismo de C y N lo que hace adaptarse en un ambiente competitivo en la rizosfera. El amonio, nitrito, nitrato, aminoácidos y nitrógeno molecular puede servir como fuente de nitrógeno.

Azospirillum incrementa considerablemente el número y longitud de los pelos radicales, el ritmo de aparición y número de raíces laterales, el diámetro y longitud de raíces adventicias y laterales, y el área de superficie de la raíz. La intensidad de estos efectos en la morfología de la raíz depende de la especie de planta y de la cantidad de inóculo utilizado. Se han reportado incrementos en la masa seca y contenido total de nitrógeno de plantas inoculadas con *Azospirillum*, como son: maíz, trigo y sorgo, entre otros. También se han reportado otros ensayos de inoculación con este microorganismo, con escasos o nulos efectos (Paredes-Cardona E. et al., 1988).

Coloniza la parte interna o externa de la raíz, en donde las bacterias tienden a formar pequeños agregados, aunque se les puede encontrar aisladamente distribuidas a lo largo de la superficie radicular, embebidas en la capa mucilaginoso que cubre la raíz. En el proceso de colonización interna, las células de *Azospirillum* penetran a través de los espacios intercelulares (Andreeva et al., 1991., citado por Sanchez Colín, 2000).

En cereales, la colonización ocurre principalmente en las zonas de elongación de la raíz y de los pelos absorbentes (Zamudio y Bastarrachea, 1994., citado por Sánchez Colín, 2000). Se desconoce el mecanismo de penetración de *Azospirillum* a los espacios intercelulares. Hay 3 teorías propuestas:

1. Invasión bacteriana vía tejidos corticales, en la zona donde emergen las raíces laterales en raíces principales.
2. Invasión a través de pelos radicales lisados y heridas mecánicas ocasionadas durante el crecimiento de la planta.
3. Penetración directa a través de lamelas intermedias seguidas de degradación de la pectina una vez que la bacteria logra penetrar por hendiduras de la zona cubierta por la epidermis en donde emerge la raíz (Bashan *et al.*, 1996).

Se reportan dos mecanismos de adhesión de *Azospirillum*. El primero consiste en una adhesión rápida y débil que depende de proteínas superficiales bacterianas, las que al ser lavadas con agua liberan fácilmente a la bacteria. El segundo mecanismo llamado “anclaje”, se ha verificado en condiciones *in vitro* y es independiente del primero, éste consiste en un anclaje firme, caracterizado por la producción de fibrillas largas, que forman una red que conecta las células de *Azospirillum* entre sí y a la superficie radicular (Michiels *et al.*, 1991).

Distribución ecológica

Azospirillum tiene una distribución generalizada, se ha reportado en una gran variedad de suelos y de regímenes climáticos, como zonas tropicales, semitropicales, húmedas frías y frías. Al parecer *Azospirillum* es una bacteria que no muestra especificidad por algún tipo de raíz pudiéndose encontrar en diversos tipos de plantas. Se ha aislado de raíces de vegetales muy diversos como maíz, trigo, sorgo, avena, centeno, cactáceas (Ramirez-Gama y Luna-Millan, 1995., citado por Sanchez Colín, 2000), jitomate, soya, algodón, pimienta (Bashan *et al.*, 1990), *Cassuarina cunninghamiana* y se ha observado en mayor incidencia en pastos como *Panicum maximum*, *Panicum miliacetum*, *Cenchrus ciliaris*, *Pennisetum americanum* y *Setaria italica*. Entre todos los miembros del género *Azospirillum*, genes regulatorios y estructurales se envuelven en la fijación del nitrógeno. Su mejor asimilación ha sido caracterizada por *A. brasilense*. La regulación de la fijación del nitrógeno y su asimilación es de interés fundamental y tiene importancia práctica para la asociación *Azospirillum*-planta desde que puede influenciar tanto la habilidad de la bacteria para propagarse en la rizosfera como la posibilidad de generar nitrógeno disponible para la planta.

El método de inoculación más simple y común en laboratorio y así como en experimentos en invernaderos, es por medio de la aplicación de la bacteria en una suspensión líquida (medio de cultivo) ya sea directamente al suelo, las semillas o plántulas, sumergiéndolas o mojándolas con la suspensión.

Algunas cepas de *Azospirillum* tienen mecanismos específicos para interactuar con la raíz y colonizar en un momento dado hasta su interior, mientras que otras colonizan la capa mucilaginoso o herida de las células corticales de la raíz.

Monitoreando la manera de colonización de *Azospirillum brasilense* Sp245 en raíces de trigo usando una expresión constitutiva del gene de *gusA* de *Escherichia coli*, fue demostrado que los lugares de colonización de la raíz primaria son los puntos de emergencia de las raíces laterales y de los pelos radicales. *Azospirillum brasilense* Sp245 fue detectado en el xilema de la raíz de trigo brasileño, mientras que *Azospirillum brasilense* Sp7 fue restringido al suelo de la rizosfera, principalmente en la zona de los pelos radicales de trigo del mismo país (Oda, 2000).

Eficiencia de los inóculos de *Azospirillum*

Los primeros resultados de los experimentos en los que se inoculaba *Azospirillum* permitió ver un horizonte muy optimista acerca del potencial de esta bacteria para promover el crecimiento y

rendimiento de la planta. Las plantas inoculadas mostraron un incremento en el rendimiento de casi todos los componentes, ej. peso en seco de la planta, contenido de nitrógeno en ramas y granos, número de espigas, número de granos por espiga, peso del grano, altura de la planta y tamaño de las hojas. Okon y Labandera González evaluaron 20 años de experimentos de campo consecutivos de importancia agronómica en diferentes suelos y bajo diversas condiciones climatológicas. Ellos estimaron que de 60 a 70% de todos los experimentos de campo fueron exitosos con incrementos en el rendimiento en un rango del 5 al 30%. Los efectos fueron más altos en campos con fertilizaciones moderadas con N, P y K, indicando que la inoculación con *Azospirillum* no reemplaza la fertilización con N, pero en cambio mejora su utilización, conllevando a una misma productividad de las cosechas con menores niveles de fertilizante. A pesar de los numerosos resultados positivos, la inoculación con *Azospirillum* todavía tiene inconsistencias y no es predecible lo cual restringe su mayor desarrollo como un inoculante comercial a gran escala. Parte de esta inconsistencia en las respuestas de rendimiento puede ser atribuida a factores ecológicos y ambientales, las condiciones fisicoquímicas del suelo y la habilidad de la bacteria para establecerse y competir con la microflora nativa. Sin embargo, el parámetro crítico para el éxito es sin duda la preparación del inóculo y el método usado en campo.

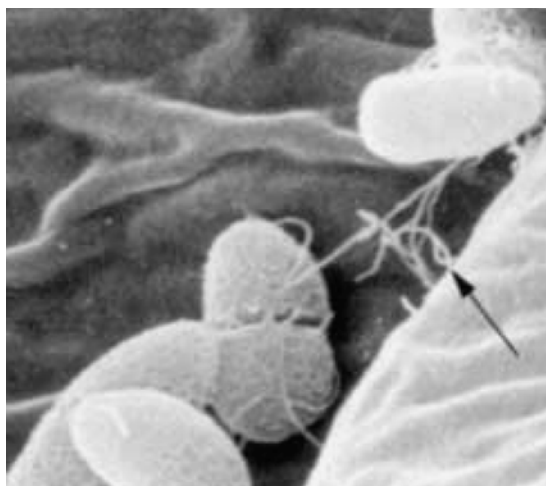


Foto 14. *Azospirillum brasilense*
(Holguin, B.R. Glick, 2004)

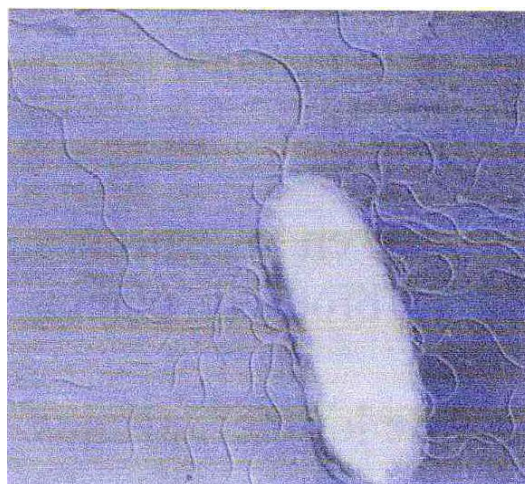


Foto 15. *Azospirillum brasilense*
(Holguin, B.R. Glick, 2004)

3.6. Interacciones de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) con microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre

Debido al interés de determinadas bacterias fijadoras de N_2 en vida libre como posibles fertilizantes biológicos, se ha prestado especial atención al estudio de su interacción con micorrizas.

Por ejemplo, *Azotobacter* muestra interacciones positivas con las micorrizas, en el sentido de mejorar la colonización micorrícica de la planta y de estimular su crecimiento (Ho, 1988., citado por Cordoba, 1999). Sin embargo, estos efectos sinérgicos parecen estar más relacionados con la producción de hormonas por parte de la bacteria que con su capacidad para fijar nitrógeno. Esto se deduce a partir de la escasa capacidad de estas bacterias para exportar el amonio obtenido desde la célula bacteriana a la planta. Por otro lado, también se ha descrito un efecto beneficioso de la micorriza sobre el establecimiento de poblaciones de *Azotobacter* en el suelo (Ho, 1988., citado por Cordoba, 1999).

Las interacciones de micorrizas arbusculares y *Azospirillum* siguen una tendencia similar a la descrita para *Azotobacter*. Se han encontrados incrementos en los niveles de colonización micorrícica y efectos aditivos o sinérgicos de la doble inoculación sobre el crecimiento y la

nutrición de las plantas (Barea *et al.*, 1983., citado por Cordoba, 1999). Al igual que ocurre con *Azotobacter*, parece ser que los efectos son debidos más a la producción de hormonas por la bacteria, que a su capacidad para fijar N₂ (Harari *et al.*, 1988., citado por Cordoba, 1999).

La inoculación mixta con *Azospirillum* y hongos micorrizógenos arbusculares origina una interacción sinérgica, obteniéndose un incremento significativo en crecimiento y el contenido de fósforo de las plantas. Esta inoculación doble podría reemplazar la aplicación de fertilizantes de nitrógeno y fósforo, además de promover la colonización de hongos micorrícicos en plantas, incrementando la germinación de esporas de *Glomus* sp. (Benthlenfalvay, 1996; Arroyo *et al.*, 1996., citados por Sanchez Colín, 2000).

3.7. Interacción de los HMA con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

Estudios sobre el mecanismo de promoción del crecimiento por rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal indican que estas bacterias actúan fundamentalmente de forma indirecta, mediante un cambio en el balance microbiano en la rizosfera (Kloepper *et al.*, 1991). Algunas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal producen sideróforos, los cuales son antibióticos o CHN, que se han implicado en la reducción en la rizosfera de patógenos de la planta o de bacterias con efectos deletéreos. Es por ello que se les ha atribuido un papel importante en el control biológico de patógenos (Kloepper, 1992., citado por Cordoba, 1999).

Los sideróforos (compuestos microbianos que transportan Fe³⁺) son sustancias extracelulares de bajo peso molecular. Estos compuestos juegan un papel importante en el crecimiento de las plantas y en el control biológico de enfermedades. Son producidos por la mayoría de los hongos y bacterias, incluyendo *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Azotobacter*. Estos compuestos secuestran el Fe, haciéndolo no disponible para otros microorganismos del suelo que carecen del sistema de asimilación de Fe para el sideróforo en cuestión. Estos pueden favorecer a las plantas quelando el Fe, solubilizándolo y permitiendo su transporte a las superficie de absorción. A partir de estos quelatos las plantas tendrían que asimilar el Fe, porque en caso contrario desarrollarían clorosis férrica. Las plantas al igual que los microorganismos, parecen ser selectivas en cuanto a los sideróforos que pueden utilizar y les pueden proporcionar Fe (Leóng, 1986, citado por Cordoba, 1999).

Algunas de las PGPR con actividad en control biológico muestran *in vitro* antibiosis hacia el patógeno, pero otras no. Estudios sugieren que las PGPR ejercen el biocontrol a través de dos mecanismos:

1. El control de la enfermedad mediante el antagonismo hacia el patógeno
2. Cambio en la susceptibilidad en la planta hospedera, ej. induciendo la resistencia.

Además de este efecto indirecto sobre el control biológico de patógenos en el suelo, algunos ecotipos de PGPR pueden ejercer otros efectos sobre las plantas, tales como la estimulación de la nodulación por *Rhizobium* en leguminosas (rizobacterias promotoras de la nodulación, NPR) y la mejora en la emergencia de las semillas (rizobacterias promotoras de la emergencia, EPR). En algunas plantas este último efecto estaba asociado en un incremento en el área foliar. También se han puesto de manifiesto efectos estimuladores sobre la elongación de las raíces y formación de pelos radicales (Kloepper *et al.*, 1991).

Muy pocos estudios han examinado la interacción entre PGPR y HMA. Las PGPR podrían antagonizar no solo los patógenos, sino también a los hongos formadores de micorrizas, mediante la producción de compuestos antifúngicos o sideróforos. De otro lado, los HMA inducen cambios importantes sobre las poblaciones de ciertos microorganismos del suelo y consecuentemente, podrían también estimular o inhibir la colonización y el establecimiento de las PGPR. En un estudio de Meyer y Linderman (1986., citado por Cordoba, 1999), se investigó la interacción entre la PGPR *Pseudomonas putida* y la nodulación de plantas de trébol

doblemente inoculadas con la PGPR y *Glomus*, en relación con las inoculadas con un solo de los microorganismos, o los controles no inoculados. La inoculación de la PGPR estimuló inicialmente la colonización del sistema radical por el HMA, aunque los niveles finales de micorrización no resultaron afectados. No se observaron diferencias en el tamaño de las poblaciones de la PGPR en la rizosfera de las plantas micorrizadas o en la de los controles no micorrizados.

En plantas de arroz, la doble inoculación con HMA y *Pseudomonas* spp. con características de PGPR promovía también las plantas de mayor biomasa y contenido nutrimental. Sin embargo, en este estudio se observó una reducción en la colonización micorrícica de la planta cuando se inoculaba al HMA conjuntamente con la PGPR (Dhillion, 1992., citado por Cordoba, 1999).

En otros trabajos se ha demostrado que las poblaciones de varios ecotipos de la PGPR *Pseudomonas putida* eran inicialmente menores en plantas micorrizadas con *Glomus intraradices*, aunque no se detectaban diferencias apreciables en las micorrizadas con *Glomus etunicatum* (Paulitz y Linderman, 1989., citado por Cordoba, 1999).

Estos resultados sugieren que la interacción entre PGPR y micorrizas puede ser selectiva y depende de la bacteria y hongos implicados, lo cual ha sido confirmado en otros estudios (Azcón, 1989., citado por Cordoba, 1999).

4. Justificación científica

El estudio de los efectos que provoca en el desarrollo la colonización de plántulas de *Agave salmiana* var. *salmiana* por hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) y *Azospirillum brasilense* (Ab) ha sido poco estudiado (como es el caso del estudio realizado por Luna Camacho (2005) que trata de la Influencia de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) sobre el desarrollo de *Agave salmiana* y *Opuntia Streptacantha* en condiciones de invernadero.) Por lo que los resultados de este experimento brinda información valiosa para el mayor entendimiento de la relación HMA-planta, Ab-planta y HMA+Ab-planta.

La información obtenida de este experimento puede ser utilizada para la conducción de programas de restauración ecológica, que si son manejados adecuadamente se obtendría como resultado una exitosa recuperación de ecosistemas deteriorados por causa de las actividades humanas u otras.

Así también, el hecho de que este estudio se llevó a cabo sobre plántulas de *Agave salmiana* var. *salmiana* fue debido a que esta planta desde la antigüedad hasta ahora ha jugado un papel importante en el desarrollo de diversas culturas americanas, ya que a partir de ella se pueden obtener productos que sirven como alimento tanto para animales no humanos como para humanos, sustancias de valor económico (aguamiel y pulque), y materiales que brindan abrigo y techo. Además, esta planta se caracteriza por ser capaz de encontrarse en una variedad de climas, resaltando aquel en el cual puede soportar la sequía, pudiendo formar así islas de recursos, que conllevan al establecimiento de otros de tipos de plantas y por ende retención de suelo y humedad, factores que contribuyen al mejoramiento y permanencia de un ecosistema sano.

El uso de *Azospirillum brasilense*, es importante, ya que como se ha demostrado en varios estudios (consultar a Cordoba, 1999), el uso de dos microorganismos puede tener como consecuencia mejores resultados en el desarrollo de las plantas, y aunque no se evaluó en este experimento, es posible que una planta inoculada con dos microorganismos (si son los adecuados), logre una mayor tasa de establecimiento y supervivencia en condiciones de campo.

5. Planteamiento del problema

¿Cuál es el efecto de HMA, *Azospirillum brasilense* y HMA+*Azospirillum brasilense* sobre la tasa de crecimiento relativa de plántulas de *Agave salmiana* var. *salmiana*?

¿Cuál es el porcentaje de colonización micorrícica en presencia de *Azospirillum brasilense*?

¿Cuál es el número de Unidades Formadoras de Células (UFC) en presencia de Hongos Micorrizógenos Arbusculares?

¿Hay un incremento en el uso eficiente del agua (WUE), cuando se encuentran los dos microorganismos (HMA y *Azospirillum brasilense*), que cuando solo se encuentra uno de éstos?

6. Hipótesis

Si se sabe, que los Hongos Micorrizógenos Arbusculares y *Azospirillum brasilense* aumentan la captación de nutrimentos y agua debido a que incrementan la superficie de contacto de la planta con el sustrato que le rodea, entonces aquellos tratamientos suministrados a *Agave salmiana* var. *salmiana* que contengan a estos microorganismos en conjunto o por separado, aumentarán de manera significativa el desarrollo de dicha planta.

Así también, se sabe que la interacción entre HMA y *Azospirillum brasilense* es sinérgica, lo que provocará en el tratamiento doblemente inoculado una mayor colonización micorrícica y bacteriana, así como un incremento en el uso eficiente del agua de *Agave salmiana* var. *salmiana* en comparación con los tratamientos con una sola inoculación.

7. Objetivo

Comparar la influencia de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), de *Azospirillum brasilense* (Ab) y de HMA+Ab sobre el desarrollo de *Agave salmiana* var. *salmiana*.

Objetivos específicos

Comparar la colonización micorrícica y bacteriana cuando se encuentra a los microorganismos empleados por separado e interactuando.

Comparar el uso eficiente del agua cuando se encuentran a los microorganismos empleados en conjunto y por separado.

8. Metodología

8.1. Sitio de experimentación

Se llevó a cabo en el Invernadero de la FES Zaragoza *Campus II*, de la UNAM, con orientación norte-sur en la zona oriente de la Ciudad de México.

8.2. Determinación de las propiedades físicas y químicas del sustrato

Sustrato. Consistió en una mezcla de suelo proveniente del municipio de Santiago de Anaya, Hidalgo, con arena sílica en una proporción 1:1 (v/v). Cabe resaltar, que antes de proceder a efectuar la mezcla el suelo fue tamizado con una malla de 2 mm, además una vez realizada la mezcla, ésta se esterilizó en un autoclave a 15 libras de presión por pulgada cuadrada durante dos horas, 3 veces, para asegurar la eliminación de cualquier microorganismo que pudiera afectar los resultados del experimento.

Análisis físico y químicos: Se realizaron los análisis correspondientes para el sustrato empleado antes y después del experimento: Color (tablas Munsell), Densidad Aparente (método de la probeta), Densidad Real (método del picnómetro), porcentaje de Espacio Poroso, Textura (Hidrometro de Bouyoucos), pH (potenciométrico, suelo-agua 1:1., y pasta de saturación), Capacidad de Intercambio Cationico (Acetato de Amonio), Materia Orgánica (Walkey – Black), Fósforo extraíble (Olsen), Nitrógeno total (Kjeldhal) y Conductividad Eléctrica (potenciométrico).

Para más detalle, remitirse al anexo 1, 2 y 3.

8.3. Pruebas de viabilidad y germinación

La capacidad de las semillas para germinar y producir una planta normal, es el principal atributo a considerar para evaluar su calidad y potencial. Es importante resaltar, que la eficacia y el éxito de la producción de plantas en el vivero y su establecimiento posterior en la plantación, dependen en gran medida de la calidad de la semilla que se utiliza (De la Garza, 1994). Por lo que para conocer la calidad de un lote específico de semilla, es importante la aplicación de métodos de ensayo que sean confiables, uniformes y reproducibles.

El propósito principal del análisis de semillas es emitir una estimación precisa de la capacidad de un lote de semillas para producir plantas sanas, vigorosas y adecuadas para la plantación en campo (William, 1991., citado por De la Garza, 1994).

Las semillas utilizadas en el experimento provienen del municipio de Santiago de Anaya, Hgo. en donde se seleccionaron al azar tres plantas de *Agave salmiana* var. *salmiana* que presentaran inflorescencia con semillas maduras, de donde se tomaron las que se considero pertinentes.

Viabilidad

Se llevaron a cabo 5 repeticiones con lotes de 20 semillas cada una, utilizando el método de inmersión de semillas en agua., donde las semillas que permanecen a flote se cuentan como no viables y las que se hunden se toman como viables.

% de viabilidad = $\frac{\text{No de semillas sumergidas}}{\text{Total de semillas}} \times 100$

No total de semillas en la muestra

Germinación

Se llevó a cabo una prueba de germinación directa donde las semillas fueron puestas a germinar de dos formas:

- cinco lotes de 20 semillas, las cuales fueron colocadas en cajas Petri con algodón humedecido con agua de la llave en condiciones de invernadero.
- cinco lotes de 20 semillas, las cuales fueron colocadas en cajas Petri con algodón humedecido con agua de la llave en condiciones de cámara de germinación a una temperatura de 30° C.

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{No de semillas germinadas}}{\text{No de semillas totales de la muestra}} \times 100$$

8.4. Propagación y evaluación del inóculo bacteriano

La propagación de *Azospirillum brasilense* se llevó a cabo a través de un medio de cultivo llamado Novo Fábio Pedrosa (NFb) que se prepara de la siguiente manera (por litro):

5 g ácido málico
0.5 g K_2HPO_4
0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0.1 g NaCl
0.02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
2 mL solución de micronutrientes
4 mL FeEDTA (solución al 1,64%)
4.5 g KOH
0.05 g extracto de levadura
Ajustar a pH de 6.5 – 6.8 con NaOH y completar a volumen para 1000 mL con agua destilada.
Añadir los reactivos en el orden indicado.
Para medio semi-sólido, adicionar 1.75-1.8g de agar/L y para un medio sólido agregar 15 g de agar/L.

-Solución de micronutrientes

1 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
1.175 g $MnSO_4 \cdot H_2O$
Completar a volumen para 100 mL con agua destilada.

Una vez listo el medio de cultivo se añadió con un asa bacteriológica esterilizada una muestra de *Azospirillum brasilense* CD que fue donada por el Instituto de Fijación de Nitrógeno (UNAM). La señal que indica que las bacterias han empezado a reproducirse (aproximadamente 24 horas después de hacer la siembra) es que el medio de cultivo (líquido) se ha enturbiado y cambiado de color de verde a azul y con una subsecuente formación de una película blanca aproximadamente a 2mm de la superficie.



Foto 16. Cepa de *Azospirillum brasilense* donada por el Instituto de Fijación de Nitrógeno

Foto 17. Propagación del inóculo

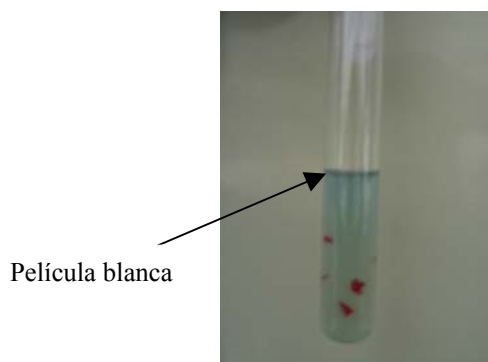


Foto 18. Se aprecia la película blanca que indica la presencia de *Azospirillum brasilense*

8.5. Inóculo de micorriza arbuscular

Fue obtenido a partir del suelo muestreado en el municipio de Santiago de Anaya, Hgo., y que fue posteriormente masificado con la planta trampa *Lolium multiflorum* (pasto rye grass). Este pasto fue inoculado con suelo rizósferico de *Bouteloa gracilis* (gramínea que a probado estar asociada con los HMA) proveniente de una zona poco perturbada del lugar arriba mencionado.

El pasto rye grass se dejó crecer por un periodo de 3 meses bajo condiciones de invernadero, regándole con agua corriente cada vez que lo requería, una vez transcurrido este tiempo se sometió a stress hídrico hasta su muerte para propiciar la esporulación del hongo y proseguir entonces con el conteo del número de esporas que se realiza por el método de tamizado y decantación en húmedo (Genderman y Nicolson, 1963) el cual consiste en lo siguiente:

- 1) Se pesan 100g de suelo y se llevan a una suspensión en 2 000 mL de agua.
- 2) Se agita manual y vigorosamente durante un periodo de 5 minutos y se deja decantar por 3 minutos (con la finalidad de eliminar partículas grandes por sedimentación).
- 3) La suspensión se pasa a través de un tamiz de 105 y uno de 44 μm . Reteniendo así en el primero materia orgánica y a las esporas de mayor tamaño, mientras que en el segundo a las de menor tamaño.
- 4) Este procedimiento se repite dos veces más.
- 5) La fracción orgánica obtenida en el tamiz de 105 μm se pasa a una caja Petri, la cual es examinada con ayuda de un estereoscopio para hacer el conteo y la extracción manual de esporas.
- 6) De igual manera la fracción obtenida en el tamiz de 44 μm se pasa a una caja Petri, la cual es examinada con ayuda de un estereoscopio para hacer la extracción y el conteo de esporas.

Se obtuvo un promedio total de 65 por cada 50 gramos de suelo.

8.6. Análisis de *Azospirillum* en Santiago de Anaya, Hidalgo.

Se colectaron raíces de gramíneas cercanas a cinco plantas de *Agave salmiana* var. *salmiana*, así como raíces de esta, se envolvieron entonces en papel estraza y se trasladaron al laboratorio. Para determinar la presencia de *Azospirillum*, se procedió a lavarlas con agua corriente hasta que quedaran libres de suelo, posteriormente se lavaron con abundante agua destilada, se sumergieron en cloro al 10% durante 3 minutos para desinfectar, se enjuagaron con agua

destilada estéril hasta eliminar completamente el cloro bajo campana y en condiciones de esterilidad y se maceraron (1g de raíz). Entonces se procedió a inocular el medio NFb (con el macerado) previamente colocado en tubos de ensaye, dejando incubar de 24-48 h. a 32° C. Se realizaron 3 repeticiones por planta, obteniendo un total de 30 ensayos, de los cuales 15 correspondieron a *Agave* y 15 a gramíneas.

8.7. Inoculación bacteriana y de hongos micorrícicos arbusculares

Se prepararon 80 macetas cuyas dimensiones son de 16.3 cm de alto y 10.2 cm de diámetro en la base como sigue:

20 macetas con 1700 g de mezcla estéril

20 macetas con 1600 g de mezcla estéril más 100 g de inoculo micorrícico

20 macetas con 1700 g de mezcla estéril más 1 mL de inoculo *Azospirillum brasilense*

20 macetas con 1600 g de mezcla estéril más 100 g de inoculo micorriza/1 mL *Azospirillum brasilense*

El inoculo bacteriano y micorrícico se agrego sobre la base de las plántulas en contacto con las raíces.

8.8. Determinación del número de esporas de micorrizas arbusculares (MA) en el inóculo y evaluación bacteriana

Número de esporas de MA en el inóculo

Se realizó el conteo de esporas por cada 50 g de inóculo por medio de la técnica de tamizado húmedo y decantación (Gerdermann y Nicolson, 1963) (Anexo 5). Posteriormente fueron cuantificadas con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Evaluación de la inoculación bacteriana

Para asegurarse de la infección bacteriana por parte de la plántula, se sacrificó una de éstas a los tres meses de edad habiendo sido seleccionada al azar dentro de los tratamientos a los cuales fue suministrada, para lo cual se llevo a cabo el siguiente procedimiento:

Se lavaron las raíces de las plántulas cuidadosa y abundantemente con agua corriente para eliminar el suelo adherido, posteriormente se lavaron con abundante agua destilada. Entonces se procedió a separar las raíces del resto de la plántula mediante un corte a nivel de la corona. Se sumergieron en cloro al 10% durante 3 minutos para desinfectar, se enjuagaron con agua destilada estéril hasta eliminar completamente el cloro bajo campana y al lado de dos mecheros encendidos; después se transfirieron utilizando pinzas previamente esterilizadas y expuestas rápidamente a la llama y finalmente se determinó en las raíces la presencia de *Azospirillum* mediante su macerado (1 g). Se procedió entonces a inocular el medio NFb por medio de la toma de una muestra del macerado por medio de una asa bacteriológica previamente esterilizada y sometida a la flama y se dejó incubar de 24-48 h. a 32° C. La formación de una película blanca de 2 a 3 mm por debajo de la superficie del medio y el vire del indicador de verde a azul por alcalinización del medio permitió saber que la raíces habían sido colonizadas.

8.9. Porcentaje de supervivencia

El porcentaje de supervivencia de *Agave salmiana* var. *salmiana* se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\# \text{ de individuos iniciales}}{\# \text{ de individuos finales}} \times 100$$

8.10. Tasa de crecimiento relativo (TCR)

Se calculó el promedio general de crecimiento en cada uno de los tres tratamientos y el testigo para enseguida aplicarle logaritmo natural (ln) y dividirlo entre el número de días que duro el experimento; este método corresponde al modelo de crecimiento exponencial, el cual describe adecuadamente la fase del desarrollo vegetal (Charles-Edwards *et al.*, 1986).

Las mediciones se llevaron a cabo con un vernier, tomando semanalmente la altura, la cobertura vegetal máxima y mínima de la plántula.

$$TCR = \ln(Cp)/Nd \text{ en donde: } TC = \text{tasa de crecimiento}$$

Cp = crecimiento promedio por tratamiento

Nd = número de días del experimento

$$TCR = \frac{\ln(\text{altura final}) - \ln(\text{altura inicial})}{\text{número de días}}$$

8.11. Número de hojas

Se contaron semanalmente el número de hojas del individuo desde el comienzo de experimento, hasta el final de éste (un periodo total de 32 semanas).

8.12. Riego

Se llevó a cabo de una a dos veces por semana según lo requirió la planta, manteniendo el sustrato a capacidad de campo con agua destilada como medida para evitar la introducción de algún elemento externo al sustrato empleado.

8.13. Determinaciones al final del experimento

8.13.1. Evapotranspiración real (ETR) y transpiración acumuladas

La evapotranspiración real es la cantidad de agua perdida debida a la evaporación del agua contenida en el sustrato empleado más la transpiración de la planta, y se calculó pesando a las macetas después del riego y restando el peso de las mismas antes del riego de la semana siguiente:

$$ETR = PIS - PFS$$

En donde:

PIS = Peso al inicio de la semana (después de cada riego)

PFS = Peso al final de la semana (antes del riego)

La evaporación del control EC se determinó pesando las 5 macetas sin plántula después del riego y restando el peso de las mismas antes del riego de la semana siguiente:

$$EC = PCIS - PCFS$$

En donde:

PCIS = Peso del control al inicio de la semana (después de cada riego)
PCFS = Peso del control al final de la semana (antes del riego siguiente)

La transpiración de las plántulas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$TP = ETR - EC$$

En donde:

TP = Transpiración de la planta
ETR = Evapotranspiración real
EC = Evaporación del control

8.13.2. Cociente raíz-vástago (r/v)

El coeficiente raíz-vástago fue obtenido al término del experimento mediante la extracción de las plántulas a sacrificar de sus macetas (5 por tratamiento), enseguida las raicillas de éstas fueron lavadas cuidadosamente con agua corriente, se cortó la raíz del brote y se pusieron a secar junto con la parte aérea durante 48 hrs en un horno a 80°C en bolsas de papel estrasa. Para cuantificar su peso se utilizó una balanza analítica (marca Ohaus, modelo IP15KS). Posteriormente se calcularon las medias de la biomasa seca total y del cociente raíz-vástago para cada uno de los tratamientos.

8.13.3. Eficiencia en el uso del agua (WUE)

La eficiencia en el uso del agua o WUE por sus siglas en inglés (Water Use Efficiency), se define como la cantidad de materia seca producida en gramos por cada litro de agua irrigada en un periodo determinado (Salisbury y Ross, 1994); este cociente es importante ya que muestra la eficiencia del uso del agua por la planta para producir biomasa. Asimismo la eficiencia en el uso del agua se puede estimar a partir de la pérdida de agua por transpiración, la cual va acompañada de manera forzosa a la toma de CO₂ en los estomas de la planta (Nobel, 1998). Se definió la eficiencia en el uso del agua a partir del siguiente índice:

$$WUE = (\text{g de biomasa seca total}) / (\text{kg de agua total irrigada})$$

Para determinar el WUE se midió semanalmente la cantidad de agua evapotranspirada para cada uno de los tratamientos. Posteriormente, una vez obtenido el peso en seco de las plántulas se dividió los gramos de biomasa seca total entre el total de agua irrigada a lo largo del experimento.

8.13.4. Potencial hídrico

Este potencial se determina por medio del uso de la cámara de Schöllander, para lo cual se sacrifica a cinco plántulas por tratamiento cortándoles las hojas desde la base del tallo; ésta se coloca en un tapón de goma, el cual se inserta en el aparato de modo que la plántula quede de cabeza y dentro de la cámara y la base de la hoja pase a través del tapón hacia el exterior (el tapón sirve para evitar que el gas inerte (N₂) escape de dentro de la cámara), enseguida se

asegura el cabezal de la cámara girándola hasta tener la certeza que está sellada, después se inyecta nitrógeno gaseoso a presión y enseguida se abre lentamente la válvula que deja pasar el gas hacia la cámara hasta el punto de generar una presión que induce la formación de una gota de agua en la base de la hoja, entonces se detiene el flujo del gas y se toma la lectura de la presión a la que se forma la burbuja de agua en el tejido vegetal. El valor del potencial hídrico se da en megapascales.

8.13.5. Porcentaje de colonización micorrícica

El porcentaje de colonización micorrícica se obtiene por el número de hifas, vesículas y arbuscúlos encontrados en 100 campos observados con las raíces de cinco plantas. Para la tinción de las raíces se utiliza la técnica de Phillips y Hayman (Ferrera *et al.*, 1993) substituyendo el uso del autoclave por el de un microondas.

Esta técnica consiste de varios pasos: 1. Clareo. Se extrae la raíz de la plántula y se lava, se coloca en NaOH al 10% y se calienta por periodos de 25 segundos cambiando el NaOH cada vez que se enturbia, esto se repite hasta que la solución permanezca transparente. 2. Blanqueo. La raíz se enjuaga con agua destilada para después sumergirla en peróxido de hidrógeno al 10% durante 3 minutos. 3. Acidificación. Se enjuaga nuevamente con agua destilada y se agrega ácido clorhídrico al 10% durante 3 minutos. 4. Tinción. Sin enjuagar se embulle a la raíz en una solución de azul de tripano al 5% en lactoglicerol, calentando por 25 segundos, para después quitar el exceso de colorante enjuagando con lactoglicerol. 6. Montaje. Se realiza cortando trozos de aproximadamente 1cm y colocándolos paralelamente en las laminillas hasta un total de 10 (se montan 5).

7. Observación al microscopio. Se cuenta el número de secciones colonizadas, y se divide entre el número de secciones totales multiplicando por cien para obtener el porcentaje de colonización.

$$\% \text{ de colonización micorrícica} = \frac{\text{segmentos colonizados}}{\text{total de segmentos}} \times 10$$

8.13.6. Número de Unidades Formadoras de Células (UFC)

Se empleó el método de diluciones y placa vertida, el medio empleado fue el NFb con rojo de Congo; cada dilución se sembró por triplicado y se incubó a 32°C durante 72 horas. La dilución que finalmente se tomó en cuenta para realizar el conteo de las UFC fue la correspondiente a 10^3 ya que fue donde mejor se podían apreciar el número de colonias.

Se macera 0.1 g de raíz

- a) Dilución de NaCl 0.85 % (Solución Salina Isotónica –S.S.I-); 9 mL de S.S.I se depositan en un tubo de ensaye + 1 mL de macerado
- c) Tomando como base la mezcla presente en el tubo de ensaye se empiezan a preparar diferentes diluciones a las siguientes concentraciones: $10^{-2} \rightarrow 10^{-3} \rightarrow 10^{-4}$.
- d) De cada dilución se toma 1 mL y se deposita en cajas Petri.
- e) Se agrega NFb sólido (fundido) con NH_4Cl a cada caja (10 – 15 mL)
- f) Se homogeniza moviendo circularmente las cajas
- g) Se incuban de 24 - 48 horas las cajas Petri a 32 °C
- h) Se inicia el conteo de las UFC

9. Trabajo de gabinete

Diseño experimental

El experimento consistió en un diseño completamente al azar con 3 tratamientos y un testigo con 20 repeticiones cada uno, los cuales fueron regados con agua destilada a capacidad de campo.

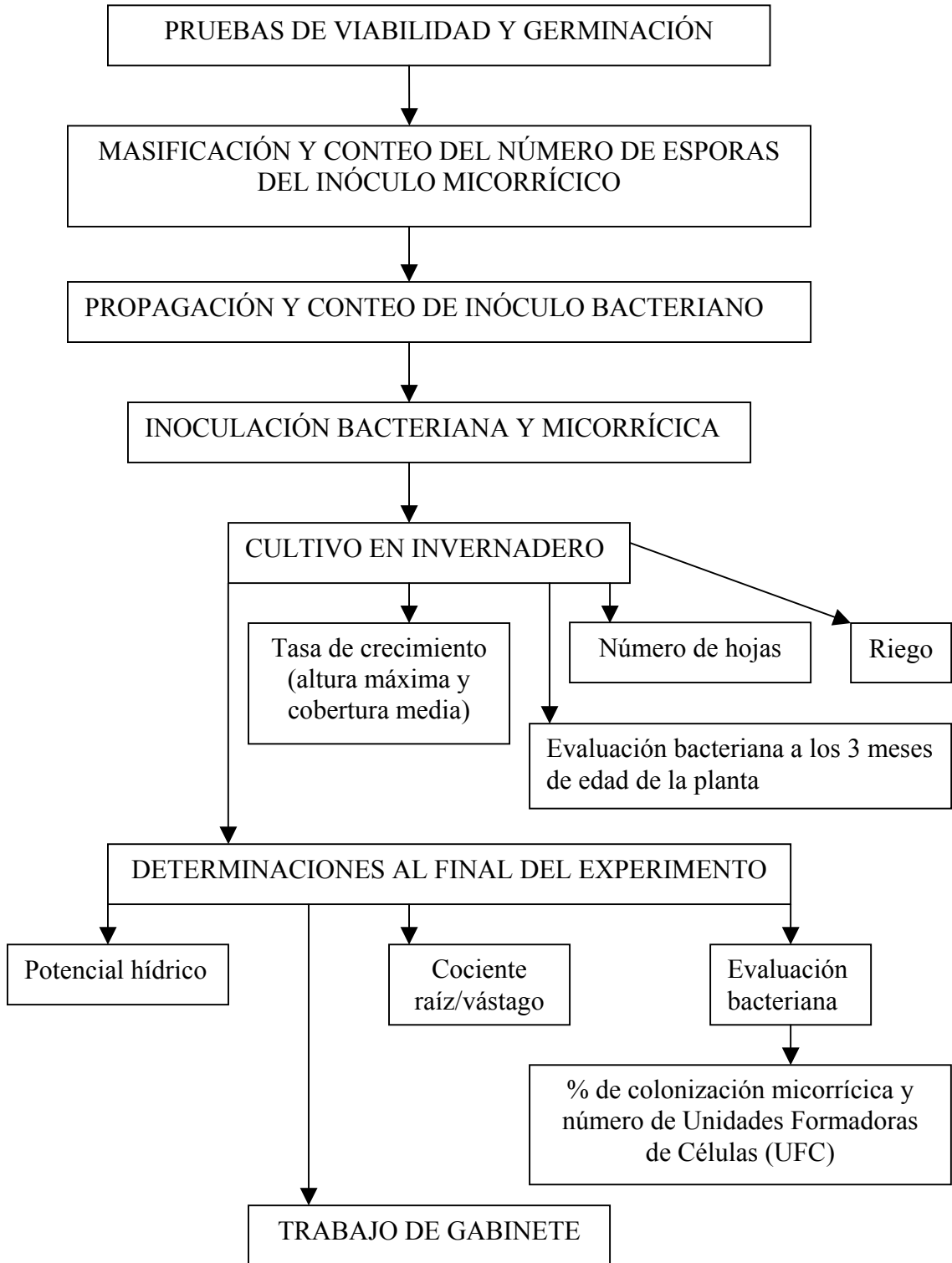
Los tratamientos y el testigo consistieron en:

- Testigo: sólo la plántula y el sustrato estéril sin ningún tipo de inóculo.
- HMA: donde se agregó al sustrato 100 g de inóculo micorrícico
- Ab: las raíces de la plántula fueron inoculadas con 1mL de *Azospirillum brasilense*
- HMA+Ab: al sustrato con la plántula se le agregaron 100 g de inóculo micorrícico y 1mL de inóculo bacteriano

Análisis estadístico

A los resultados se les aplicó pruebas estadísticas de significancia, que se basó en la comparación de medias de los diversos tratamientos y el testigo, utilizando la ANOVA de un factor y la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, según fuese el caso, utilizando el programa estadístico SPSS en inglés, versión 13.0.

10. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA



11. Resultados y discusión

11.1. Análisis del sustrato utilizado en el experimento

En el cuadro 3 y 4 se presenta la caracterización física y química del sustrato empleado antes (suelo estéril) y después (tratamientos y testigo) del experimento, estos datos son promedios de 3 repeticiones de la cuantificación de los parámetros.

CARACTERIZACIÓN FÍSICA								
Tratamiento	Color		D.A gcm ³	D.R gcm ³	% EP	Textura		
	Seco	húmedo				Arcilla	Limo	Arena
Suelo estéril	grisáceo (10YR5/2)	café muy oscuro (7.5YR2.5/2)	1.54	2.27	32.16	1.80	10.02	88.18
Testigo			1.48	2.50	40.80	1.82	11.32	86.86
HMA			1.50	2.63	42.97	0.48	11.34	88.18
Ab			1.54	2.46	49.17	1.82	11.32	86.86
HMA+Ab			1.51	2.46	54.65	2.44	11.00	86.56

Cuadro 3. Promedios obtenidos de los parámetros físicos de color, densidad aparente (D.A), densidad real (D.R), por ciento de espacio poroso (%EP), y textura, en el sustrato donde se cultivo *Agave salmiana* var. *salmiana*,

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA							
Tratamiento	pH (suelo- agua 1- 1)	pH Pasta de saturación	C.I.C. (meq/100g)	M.O. (%)	P extraíble (mg/kg)	N total (%)	C.E. (dS/m ⁻¹)
Suelo estéril	7.40	8.38	7.54	0.87	5.1171	0.0186	2.08
Testigo	7.22	7.98	7.62	0.90	17.2923	0.0395	3.32
HMA	7.18	7.74	8.40	0.83	8.8226	0.0349	3.34
Ab	7.14	7.99	6.98	0.86	17.8217	0.0372	3.80
HMA+Ab	7.16	8.12	8.58	0.76	14.1162	0.0396	3.35

Cuadro 4. Promedios obtenidos de los parámetros químicos de pH, capacidad de intercambio cationico (C.I.C.), materia orgánica (M.O.), fósforo (P), nitrógeno (N), y conductividad eléctrica (C.E.) a 25°C en el sustrato donde se cultivo *Agave salmiana* var. *salmiana*,

El cuadro 3 muestra las propiedades físicas del sustrato empleado en el experimento para antes y después de aplicados los tratamientos y el Testigo. El suelo presenta color grisáceo (10YR5/2) en seco y color café muy oscuro en húmedo (7.5YR2.5/2) según las tablas Münsell. En lo que se refiere a la textura, se clasifica como un suelo franco-arenoso, lo cual contrasta con lo reportado por Luna, (2005) quien lo clasifica como un suelo franco-arcilloso; esto es debido a que a pesar de que el suelo empleado proviene del mismo municipio, no lo es así para el sitio de colecta, el tipo de textura encontrada se caracteriza tener infiltración excesiva, capacidad de retención de humedad baja y una aireación de buena a excelente. El porcentaje de espacio poroso sufrió un incremento, teniendo un porcentaje antes del inicio de los tratamientos y el Testigo igual al 32.16%, mientras que una vez que fueron administrados estos, estuvieron en un rango de 40.80 a 54.65% lo cual fue debido a la actividad de los microorganismos y a la presencia de la misma planta que propician que se formen agregados de suelo. Presentan una densidad aparente entre 1.48-1.54 gcm⁻³ y densidad real entre 2.27-2.63 gcm⁻³, lo que concuerda con lo reportado para el mismo municipio por Luna (2005) (D.A- 1.52, D.R- 2.59) y Ortega (2006) (D.A- 1.02, D.R- 2.33).

En cuanto a las propiedades químicas mostradas en el cuadro 4, se observa que este suelo es bajo en materia orgánica, con un pH medianamente alcalino, lo cual es de esperarse para suelos de zonas áridas. La importancia de cuantificar el contenido de materia orgánica radica en que esta puede afectar (si se encuentra en porcentajes altos) otras propiedades como la estructura, aireación, drenaje, retención de humedad, capacidad de intercambio de cationes, color, D.A, D.R, E.P, y pH (Rios, 1985).

Rzedowski (1994) reporta que para la zona del municipio de Santiago de Anaya el pH varía de 6 a 8.5, con contenido de materia orgánica frecuentemente bajo.

La conductividad eléctrica muestra un suelo moderadamente salino con valores que van de 2.08-3.8 ds/m⁻¹, valor que se encuentra en el rango de tolerancia a la salinidad de agaves y cactus, ya que el crecimiento de sus raíces se inhibe de manera drástica en suelos salinos (cuando la conductividad eléctrica en la pasta de saturación es igual o mayor a 4ds/m⁻¹)(Norma Oficial Mexicana) o concentraciones de sodio de un quinto de la encontrada en el agua de mar (el agua de mar contiene más o menos 12g de sodio por litro). Por ejemplo, la exposición durante dos semanas de plántulas de *Agave deserti* a la mitad de concentración del agua de mar reduce su crecimiento en más o menos a la mitad (Nobel, 1998). La Capacidad de Intercambio de Cationes es baja siendo similar para todos los tratamientos y el Testigo, lo cual indica que es un suelo con poca fertilidad.

Los valores de nitrógeno total y fósforo extraíble encontrados en los tratamientos y el Testigo aumentaron después de haber finalizado el experimento, si lo comparamos con lo obtenido al principio de este (cuadro 4). Para nitrógeno total y fósforo los valores encontrados se consideran bajos según las tablas de interpretación para el contenido de estos elementos en el suelo que se muestran en los anexos 3 y 4.

11.2. Pruebas de viabilidad y germinación

Viabilidad

Se obtuvo por medio del método de inmersión de semillas en agua, con un porcentaje de viabilidad igual al 95%, lo cual concuerda con lo obtenido en las pruebas de germinación.

Lote	Viables	No viables
1	20	0

2	18	2
3	20	0
4	18	2
5	19	1

Cuadro 5. Muestra cuantas semillas de *Agave salmiana* son viables.

Germinación

Se llevaron acabo pruebas de germinación de *Agave salmiana* tanto en cámara de germinación como en Invernadero. Las semillas fueron colocadas en cajas petrí con algodón humedecido con agua de la llave en lotes de 20 con 5 repeticiones sin algún tratamiento pregerminativo.

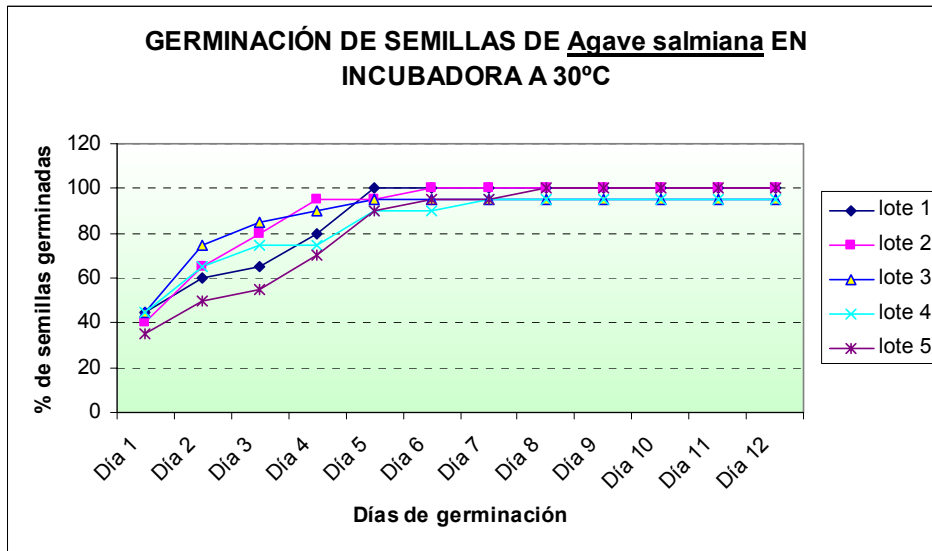


Gráfico 1. Promedio final de germinación del 98%

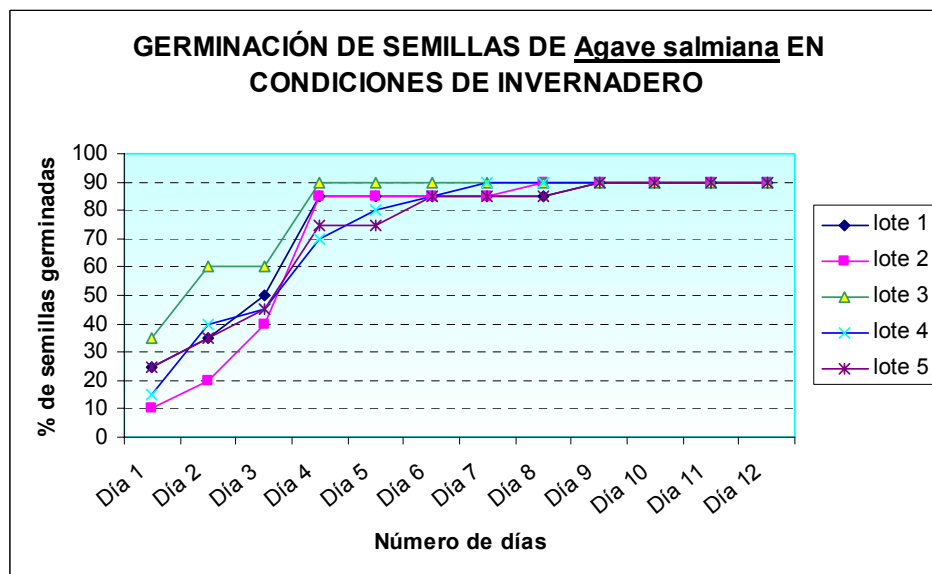


Gráfico 2. Promedio final de germinación del 90%

En ambos casos se observa que desde el día uno empieza a haber semillas germinadas; para el tratamiento en cámara de germinación desde el segundo día ya hay un alto índice de germinación, mientras que para el otro caso esta se da de manera relativamente más paulatina,

ya que para el tercer día este tratamiento también tiene un salto, de tal manera que al final el porcentaje de germinación para ambos casos supera el 90%.

Es de notar que las semillas de *Agave salmiana* son de testa blanda y endospermo carnoso, lo cual permite que no se necesite de algún tratamiento pregerminativo. Además, está reportado que las semillas de esta especie aumentan su germinación a temperaturas moderadas, mientras ésta disminuye a temperaturas por debajo de los 10 °C (Granados, 1993).



Foto 19. Semillas germinando

11.3. Análisis de *Azospirillum* en el lugar de recolecta de las semillas utilizadas en el experimento

No. de tubo	Planta	Positivo
1-3	<i>Agave salmiana</i>	2
4-6	Graminea	0
7-9	<i>Agave salmiana</i>	2
10-12	Graminea	1
13-15	<i>Agave salmiana</i>	3
16-18	Graminea	3
19-21	<i>Agave salmiana</i>	0
22-24	Graminea	2
25-27	<i>Agave salmiana</i>	1
28-30	Graminea	0

Cuadro 6. El positivo indica la presencia de *Azospirillum*,

El cuadro 6 muestra la presencia de *Azospirillum brasilense* en la columna de positivo para las raíces de gramíneas y *Agave salmiana* tomadas en campo (Municipio de Santiago de Anaya, Hgo.). Si bien no todas las repeticiones fueron positivas, esto fue debido a que se contaminaron varios tubos de ensayo que contenían la muestra. Sin embargo los resultados obtenidos en esta prueba, son suficientes para inferir la existencia de *Azospirillum* en dicha zona, y más aun, en plantas de *Agave*.



Foto 20. Raíces de gramíneas



Foto 21. Raíces de *Agave salmiana*



Foto 22. Presencia de *Azospirillum* en medio NFB

NFB

11.4. Determinación del número de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en el inóculo y evaluación bacteriana

Número de esporas de HMA en el inóculo

Se realizaron tres conteos de esporas en el inóculo utilizado por cada 50 g de suelo:

- Conteo 1= 61 esporas y 1 esporocarpio
- Conteo 2= 65 esporas y 2 esporocarpos
- Conteo 3= 68 esporas y 4 esporocarpos

Se obtuvo un promedio de esporas de 65 por cada 50 gramos de suelo.

Los géneros de esporas presentes en Santiago de Anaya (lugar de origen del suelo usado en el inóculo) corresponden a *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora* y *Glomus*, siendo este último el que se presenta en mayor número (Ortega y Ordoñez, 2006).

Concentración del inóculo bacteriano utilizado

Se llevaron a cabo tres conteos de Unidades Formadoras de Células (UFC) por mililitro de inóculo de manera similar a lo llevado a cabo en la metodología reportada para evaluación bacteriana, solamente cambiando en el hecho de que el medio NFB se inóculo con la cepa bacteriana donada por el Instituto de Fijación del Nitrógeno de la UNAM, obteniendo lo siguiente:

- Conteo 1= 15 UFC
- Conteo 2= 19 UFC
- Conteo 3= 20 UFC

Se obtuvo en promedio 18 000 UFC por cada mililitro de inóculo.

Evaluación bacteriana

A los tres meses de edad de las plántulas de *Agave salmiana*, se sacrificó una de estas al azar y se hicieron tres repeticiones, de las cuales, las tres fueron positivas, a decir de la formación de una película blanca a 2mm de la superficie del medio NFB y el virre de color de este de verde a azul.



Foto 23. Maceta seleccionada al azar



Foto 24. Agave extraído completo del tratamiento HMA+Ab.

11.5. Porcentaje de supervivencia de plántulas de *Agave salmiana*

La supervivencia de plántulas de esta especie bajo condiciones de invernadero para todos los tratamientos suministrados fue del 100%. Esto debido, por un lado a que se le mantuvo en condiciones óptimas, y por otro a que es muy resistente, lo cual queda de manifiesto en su amplia adaptabilidad a diversos climas y ecosistemas, ya que se le puede encontrar desde la costa hasta los 3000m (Granados, 1993) lo que indica que es tan capaz de soportar sequías, como periodos largos de lluvia, frío y altas temperaturas. Por ejemplo, su capacidad a la sequía esta dada gracias a su metabolismo CAM, ya que puede evitar daños fisiológicos (reducción en la eficiencia del fotosistema II, deterioro del metabolismos de las proteínas y la síntesis de aminoácidos), causados por la sequía a través de un mecanismo denominado retraso en la desecación (Tyree *et al.*, 2002., citado por Pimienta, 2006). Este se expresa mediante la asimilación nocturna de CO₂, cutículas gruesas, baja frecuencia de estomas y succulencia., esta última permite el movimiento continuo del agua almacenada del parénquima medular al clorénquima durante la estación seca del año, cuando se reduce el contenido de agua en el suelo (Nobel, 1995., Lüttge, 2004., Pimienta-Barrios *et al.*, 2005., citados por Pimienta, 2006)

Tratamiento	No. de individuos	No. sobrevivientes	% de supervivencia
Testigo	20	20	100
HMA	20	20	100
Ab	20	20	100
HMA+Ab	20	20	100

Cuadro 7. Porcentaje de supervivencia de plántulas de maguey para los diferentes tratamientos.

11.6. Tasa de crecimiento relativo (TCR)

	Testigo	HMA	Ab	HMA+Ab
Altura (cm/tiempo)	-0.00201337	-0.00223352	-0.00233317	-0.001836301
Cobertura máxima (cm/tiempo)	0.00641296	0.00666975	0.0056876	0.005901208
Cobertura mínima (cm/tiempo)	0.00189639	0.00310967	0.002118719	0.00374123

Cuadro 8. Promedios de tasa de crecimiento relativo para los diversos tratamientos suministrados a las plántulas de *Agave salmiana*

En el cuadro 8 se aprecia que para el parámetro de altura, el tratamiento de HMA+Ab y el Testigo tienden a tener medias más altas que los otros tratamientos, mientras que los que tienden a tener una mayor cobertura máxima, son Testigo y HMA. En lo que se refiere a cobertura mínima, HMA y HMA+Ab superan a los otros dos tratamientos.

Dados los resultados mostrados en el cuadro 8, se procedió a realizar la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos (apéndice I), para saber si existían diferencias significativas entre los diversos tratamientos, obteniendo lo siguiente:

En los tres parámetros aquí medidos (altura, cobertura máxima y mínima) la p fue mayor a 0.05, por lo que no hubo diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos. Esto se atribuye a que para el tiempo que duro el experimento y en relación a que el crecimiento de esta especie es lento, el poder observar diferencias entre los tratamientos tomaría de un periodo de registro mucho más extenso. Llama la atención el hecho de que el parámetro altura tenga signo negativo, lo cual fue debido a dos hechos que se conjugaron, por un lado, las mediciones comenzaron a tomarse ya que había emergido completamente el cotiledón, y por otro, a la propia fenología de la especie en cuestión, ya que al emerger el cotiledón de la semilla este se proyecta hacia arriba, mientras que las hojas lo hacen hacia los lados, de tal manera que para el tiempo que duró el experimento, las hojas no pudieron en la mayoría de los casos rebasar la altura del cotiledón.

11.7. Análisis de altura, cobertura máxima, mínima, y número de hojas

Parámetro	Testigo	HMA	Ab	HMA+Ab
Altura (cm)	2.293	2.2275	2.2255	2.9831
Cobertura máxima (cm)	3.602	4.382	3.5015	4.0505
Cobertura mínima (cm)	1.069	1.5115	1.04	1.7147
Número de hojas	3.24	3.5	3.305	4.03

Cuadro 9. Promedios de altura, cobertura máxima, mínima y número de hojas al final de las mediciones después de 32 semanas de haber iniciado el experimento.

En el cuadro 9, se aprecia que el mayor promedio para el parámetro de altura corresponde al tratamiento de HMA+Ab (2.9831 cm), seguido de Testigo (2.293cm), HMA (2.2275 cm) y Ab (2.2255cm). Para cobertura máxima HMA tiende a tener la media más alta, quedando al fondo Ab, mientras que HMA+Ab supero al Testigo. En cobertura mínima HMA y HMA+Ab superaron a Ab y al Testigo con 1.5115cm y 1.7147cm respectivamente. En el parámetro de número de hojas, el tratamiento que obtuvo el mayor promedio fue HMA+Ab como se observa en el cuadro.

Habiendo obtenido los resultados anteriores, se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis, obteniendo diferencias significativas solamente para el parámetro de número de hojas entre HMA+Ab y el resto de los tratamientos y el Testigo con una $p=0.024$ (apéndice II.2). Las diferencias significativas encontradas en este parámetro, no se pueden atribuir con certeza solamente a la influencias de los microorganismos empleados, a pesar de lo reportado por Vazquez (2000) en su estudio intitulado "Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rizhosphere of maize plants" donde menciona que la doble inoculación de *Glomus deserticola* y *Azospirillum brasilense* incremento el crecimiento de plantas de maíz significativamente en comparación con plantas control no inoculadas o con alguno de los microorganismos utilizados por si solos, ya que si bien los microorganismos aquí empleados, pudieron influenciar a las plantas para captar una mayor

cantidad de nutrimentos y por ende la manutención de un mayor número de hojas esto también pudo ser debido a la plasticidad ecológica de las plantas.



Foto 25. Testigo



Foto 26. Tratamiento HMA



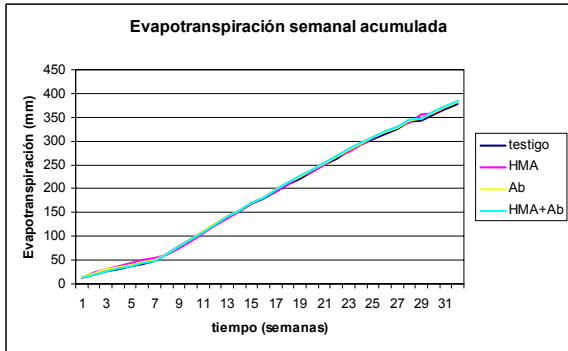
Foto 27. Tratamiento Ab



Foto 28. Tratamiento HMA+Ab

11.8. Determinaciones al final del experimento

Evapotranspiración real (ETR) y Transpiración acumulada



Testigo HMA Ab HMA+Ab

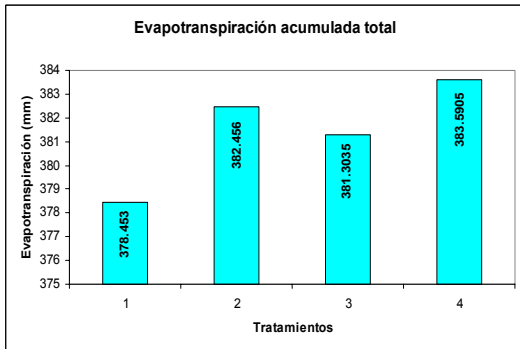


Gráfico 3. Comportamiento de la evapotranspiración en milímetros por semana para los tratamientos en *Agave salmiana*

Gráfico 4. Promedios de evapotranspiración acumulada total en milímetros para los tratamientos en *Agave salmiana*

En los gráficos 3 y 4 se aprecia la evapotranspiración real (ETR) acumulada, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, ya que todos presentaron una ETR similar y una $p = 0.995$, esto puede ser debido a que el metabolismo que presentan este tipo de plantas es C.A.M. por sus siglas en inglés (Crassulacean acid metabolism), el cual se caracteriza por efectuar el intercambio gaseoso (CO_2 \leftarrow O_2) por la noche para evitar la deshidratación por la apertura de los estomas. \leftarrow

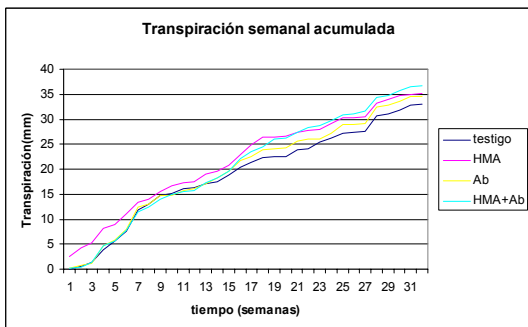
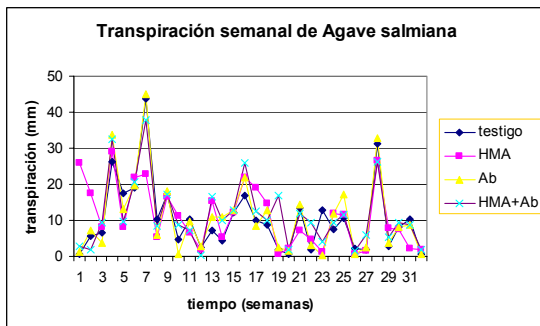


Gráfico 5. Comportamiento de la transpiración en milímetros por semana para los tratamientos en *Agave salmiana*.

Gráfico 6. Comportamiento de la transpiración semanal acumulada en milímetros por semana para los tratamientos en *Agave salmiana*

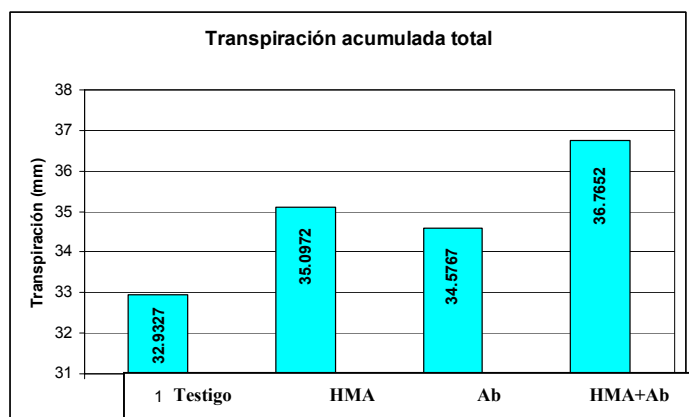


Gráfico 7. Promedios de transpiración acumulada total en milímetros para los tratamientos en *Agave salmiana*

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a la transpiración semanal ($p=0.967$) y la transpiración semanal acumulada ($p=0.659$) para este periodo de tiempo (apéndice III) debido a que esta planta es de un ciclo de vida largo, lo cual combinado con los porcentajes de colonización micorrícica y número de UFC que fueron bajos, no fueron suficientes como para presentar a tal periodo mayores diferencias entre los tratamientos y el Testigo. Sin embargo, en los gráficos 6 y 7 se puede apreciar tendencias que indican que las plantas que fueron inoculadas con uno o ambos microorganismos transpiraron más que el Testigo. Lo cual puede atribuirse a que estos a pesar de encontrarse en bajo número (ver tabla de porcentaje de colonización micorrícica y número de UFC) tal vez influenciaron el desarrollo de la planta (los hongos micorrícicos arbusculares aumentan el contenido de agua debido a un incremento en la conductividad hídrica de la planta o a una disminución de la resistencia al flujo de agua a través de ella, así también, los filamentos de estos hongos conocidos como hifas, aumentan el área de contacto de la planta con el suelo. *Azospirillum* incrementa considerablemente el número y longitud de los pelos radicales, el ritmo de aparición y número de raíces laterales, el diámetro y longitud de raíces adventicias y laterales, y el área de superficie de la raíz) de tal manera que permitieron que la planta se encontrara mejor hidratada, y por ende tuviera una mayor tasa de transpiración.

Cociente raíz/vástago y uso eficiente del agua

Tratamiento	Peso húmedo (g)		Peso seco (g)		Cociente Raíz/vástago	Agua irrigada (kg)	WUE (g/kg H ₂ O irrigada)
	Vástago (S)	Raíz (R)	Vástago (S)	Raíz (R)			
Testigo	1.5249	0.41042	0.33604	0.0254	0.07558	4.506	0.08021
HMA	1.34342	0.41822	0.41148	0.0386	0.09380	4.506	0.09988
Ab	1.16296	0.32262	0.33638	0.02138	0.06355	4.506	0.07939
HMA+Ab	1.56712	0.42562	0.37852	0.03112	0.08221	4.506	0.09090

Cuadro 10. Promedios de peso fresco y seco en gramos de las plántulas de *Agave salmiana* entre los diferentes tratamientos, así como el cociente biomasa radicular/biomasa del vástago y la eficiencia en el uso del agua (WUE) correspondientes.

No se encontraron diferencias significativas para los parámetros de peso húmedo y seco de raíz y vástago (apéndice VII), así como tampoco para el cociente raíz/vástago (apéndice IX). Sin embargo, los resultados obtenidos en peso seco total para HMA (0.45008 g), HMA+Ab (0.40964 g), Testigo (0.36144 g) y Ab (0.35776 g) contrastan con lo obtenido por Alarcón *et al.*, (2002) en su estudio intitulado “Short term effects of *Glomus claroideum* and *Azospirillum brasilense* on *Carica Papaya L.*” donde encontró que bajo condiciones de limitancia de fósforo después de 55 días del trasplante, la materia seca total producida para Ab fue 0.70 g, por debajo de lo que obtuvo el Testigo con 0.82 g, mientras que el tratamiento *G. claroides*+*A. brasilense* obtuvo el valor más alto con 1.40 g, estando por encima de *Glomus claroides* con 1.07 g.

Hampp y Schaeffer (1999), mencionan que las plantas colonizadas por HMA manifiestan un crecimiento tanto del vástago como del sistema radicular, adquiriendo este último una gran cantidad de fotosintatos en comparación con las raíces de las plantas no micorrizadas y por tanto adquieren una alta relación R/V, sin embargo, Smith y Read (1997), mencionan que trabajos realizados con plantas inoculadas con HMA presentan un cociente R/V reducido. Así también, Baldani y Döbereiner, (1980., citados por Alarcón, 2002) señalan que una de las preguntas más controversiales de la asociación con *Azospirillum* es que la especificidad afecta el crecimiento de la planta. Diferencias específicas entre plantas C3 y C4 fueron sugeridas; *A. lipoferum* fue la especie predominante colonizando plantas C4 y *A. brasilense* fue la especie predominante con las plantas C3.

Lo anterior permite comprender un poco más la forma de acción de los HMA y *Azospirillum* y así también los resultados obtenidos, los cuales señalan que para el parámetro cociente raíz/vástago (R/V), el promedio más alto fue para HMA, seguido de HMA+Ab, Testigo y Ab.

Al uso eficiente del agua (WUE) se le aplicó un ANOVA de un factor encontrando una $p=0.962$, por lo que no hay diferencias significativas entre tratamientos (apéndice VIII). Lo cual confirma en parte los resultados obtenidos por Luna Camacho (2005) en su trabajo intitulado: Influencia de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en *Agave salmiana* y *Opuntia streptacantha* en condiciones de invernadero.

Los valores presentados en el cuadro 10 muestran un mejor aprovechamiento del agua para el tratamiento HMA, seguido por HMA+Ab, Testigo y al final por Ab. Esto tal vez puede ser atribuido a la manera en que los microorganismos inoculados afectan a la planta. Así también, si se asume que estos resultados son debidos a los microorganismos inoculados, se deduce que en esta etapa del desarrollo de las plántulas, el tratamiento HMA es el primero en expresar su funcionalidad, ya que al colonizar sólo un tipo de microorganismo las raíces de la planta, a esta le es más fácil establecer la simbiosis que cuando se encuentran dos, como es el caso del tratamiento de HMA+Ab. El hecho de que el tratamiento Ab se encuentre por debajo del Testigo, puede ser debido a que el número de bacterias suministrado es bajo, de tal manera que sus efectos no son visibles para este parámetro, por lo que el inóculo debería de ser de más concentración.

Potencial hídrico

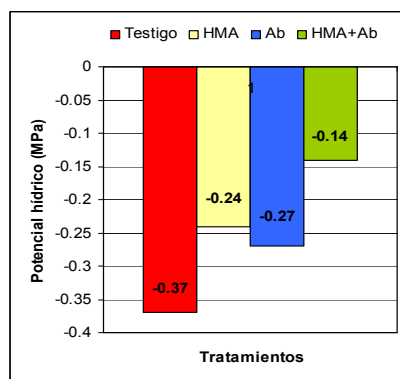


Gráfico 8. Promedios de potencial hídrico para los tratamientos y el Testigo.

Los fisiólogos vegetales usan el término potencial hídrico (Ψ_w) para referirse a la energía libre contenida o potencial químico de las moléculas de agua en el suelo, en la planta, en las células y en la atmósfera (Kramer, 1974). El potencial hídrico registra una medida del grado de hidratación de la planta. El valor registrado por el potencial hídrico es negativo, debido a que el potencial del soluto ejerce una tensión de afinidad al agua, por lo tanto se convierte en un valor negativo, y mientras sea más alto el valor obtenido, más agua tienen disponible las plántulas para el proceso de fotosíntesis y la formación de carbohidratos.

La succulencia y la apertura nocturna son mecanismos fundamentales que favorecen la tolerancia de las plantas CAM a las condiciones de sequía (Nobel, 1995., citado por Pimienta, 2006).

En el gráfico 8 se observan los valores obtenidos para potencial hídrico, donde el tratamiento de HMA+Ab es el que presenta el valor mayor (-0.14Mpa), y por ende la mayor hidratación de la plántula, seguido de HMA (-0.24Mpa), Ab (-0.27 Mpa) y Testigo (-0.37Mpa). Se realizó un análisis no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis obteniendo una $p=0.047$ (apéndice IV), por lo que hay diferencias estadísticamente significativas entre HMA+Ab y el resto de los tratamientos y el Testigo.

Si bien la simbiosis micorrícica mejora la conductividad hidráulica de la raíz para la toma y flujo de agua (González, 2003), lo cual concuerda con lo reportado por Luna (2005) (quien menciona que la micorrización favoreció el Ψ_w de plántulas de *Agave salmiana* sobre las no micorrizadas con -0.3 y -0.74 MPa respectivamente), la doble inoculación es más efectiva al lograr hidratar aun más a la planta (si se asume que estos resultados son debidos a HMA y Ab). Así también, está reportado (Sarig *et al.*, 1988 citado por Bashan *et al.*, 1990,) que para plantas de sorgo estresadas, *Azospirillum brasilense* mejoró el potencial hídrico foliar.

Contenido de fósforo y nitrógeno en suelo

Se cuantificó el contenido de fósforo y nitrógeno en suelo para antes (suelo estéril) y después (tratamientos y Testigo) del experimento por el método de Olsen y Kjeldhal respectivamente, encontrándose lo siguiente:

% N	suelo	Testigo	HMA	Ab	HMA + Ab
		0.0395	0.0349	0.0372	0.0396
	suelo estéril	0.018651286			
P (mg/kg de suelo)	suelo	17.29238181	8.8226	17.8217	14.1162
		5.117133394			
	suelo estéril	5.117133394			

Cuadro 11. Promedios de los valores obtenidos en la cuantificación de nitrógeno total y fósforo extraíble en el suelo para antes (suelo estéril) y después del experimento (suelo).

En cuanto al contenido de fósforo, no se encontraron diferencias significativas debido a alto nivel de variabilidad de este parámetro en el sustrato. Sin embargo el rango de variación está dentro del mismo orden de magnitud lo que permite deducir que el sustrato empleado variaba en el contenido de materia orgánica. Dado el corto tiempo de este estudio, es probable que los microorganismos inoculados no incidieran en un cambio en el contenido de fosfato del sustrato, ya que el proceso de descomposición de la materia orgánica por la vía biológica o química es muy lento.

En cuanto al nitrógeno, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de nitrógeno en el sustrato para antes y después del experimento con una $p=0.041$ (apéndice VI.2). Sin embargo, se puede apreciar en el cuadro 12 que los valores finales de este elemento para todos los tratamientos y el Testigo son muy similares, lo cual indica que para este periodo de tiempo los resultados para este parámetro corresponden a uno de esos casos en los que los efectos de la inoculación con *Azospirillum* son escasos según lo reporta Paredes (1988), ya que no se aprecia una diferencia significativa entre los tratamientos inoculados con dicha bacteria y los que no la contienen. Por otro lado, con lo que respecta al fósforo, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los casos (apéndice VI y VI.1).

Los valores para nitrógeno antes y después del experimento son muy similares, lo que contrasta para el contenido de fósforo que si bien no es muy similar para los distintos tratamientos, no se encontraron diferencias significativas.

Contenido de fósforo y nitrógeno en tejido vegetal

		Testigo	HMA	Ab	HMA + Ab
Nitrógeno %	Tejido aéreo vegetal	0.45097853	0.52033276	0.588	0.63357055
	raíz	0	0	0.28	0.84
Fósforo (mg/kg)	Tejido aéreo vegetal	0.85547007	0.66451066	0.9116346	0.61957903
	raíz	0.07664	1.05766238	1.03519657	0.99026495

Cuadro 12. Promedios de los valores obtenidos en la cuantificación de nitrógeno y fósforo en tejido vegetal de plántulas de *Agave salmiana* var. *salmiana*.

La inoculación mixta con *Azospirillum* y hongos micorrícicos arbusculares origina una interacción sinérgica, obteniéndose un incremento significativo en el crecimiento y contenido de fósforo de las plantas. Esta inoculación doble podría disminuir la aplicación de fósforo y hacer más eficiente la aplicación de fertilizantes de nitrógeno y fósforo, además de promover la colonización de hongos micorrícicos en plantas, incrementando la germinación de esporas de *Glomus* sp. (Benthlenfalvay, 1996; Arroyo *et al.*, 1996., citados por Cordova, 1999). A fin de conocer la asimilación de nutrientes en las plantas de *Agave*, en este trabajo se procedió a la cuantificación de fósforo y nitrógeno en tejido vegetal para la parte aérea y radical de las plantas. Posteriormente se realizaron los análisis estadísticos pertinentes encontrando diferencias significativas para fósforo en el tejido radical entre los tratamientos y el Testigo con una $p = 0.028$ (apéndice V). Esto es debido a la influencia que tuvieron los microorganismos sobre la raíz para su mayor desarrollo y captación de nutrimentos (si se asume que esto es debido a los microorganismos inoculados), en este caso el fósforo, que es un mineral limitante del crecimiento de las plantas, ya que es sabido que la actividad microbiana suele incrementar la actividad de la fosfatasa (enzimas encargadas de hidrolizar el fósforo de la forma orgánica

hasta su forma inorgánica, haciéndolo asimilable para las plantas) en el suelo. En el cuadro 12 se observa que el mayor valor para fósforo en raíz corresponde a HMA, seguido de Ab, y HMA+Ab. Así también se observa que el contenido de fósforo en tejido vegetal aéreo en contraste con lo obtenido en tejido radicular el mayor valor correspondió a Ab, seguido de Testigo, HMA y HMA+Ab.

En cuanto al porcentaje de nitrógeno en tejido vegetal y radical, se observa que aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (apéndice V), el valor más alto correspondió para HMA+Ab en ambos casos, así también presta atención que en la cuantificación de este elemento en el tejido radical, los valores que fueron diferentes a cero correspondieron solo a los tratamientos en que *Azospirillum brasilense* estuvo presente.

Es de notarse, que la mayor cantidad de fósforo y/o nitrógeno en el tejido radicular o aéreo, también depende en parte del estadio de desarrollo en que se encuentre la planta, ya que si se encuentra en el estadio de mayor crecimiento radical, esta contendrá mayor cantidad de estos y/u otros elementos en esta parte, pero si se encuentra en la fase de mayor crecimiento de tejido vegetal aéreo, los contenidos de estos elementos serán mayores en este tejido que en raíz. A este tipo de crecimiento se le denomina crecimiento rítmico.

Porcentaje de colonización micorrícica y número de unidades formadoras de células (UFC) de *Azospirillum brasilense*

Tratamiento	% de colonización micorrícica	Promedio de No. de UFC en dilución 10^3
Testigo	0	0
HMA	16.2	0
Ab	0	26.6666667
HMA+Ab	28	42

Cuadro 13. Porcentajes de colonización micorrícica y el número de unidades formadoras de células para los diversos tratamientos

El grado de colonización micorrícica depende de varios factores, entre ellos está la compatibilidad genética en los hongos simbiotes con el hospedero, exudados de la raíz, pH, salinidad, la temperatura y la humedad. La colonización micorrícica arbuscular se ha encontrado relacionada con las raíces de la familia *Cactaceae* y *Agavaceae* (Nobel, 1998).

En el cuadro 13 se observan los porcentajes de colonización micorrícica para los diversos tratamientos y el Testigo, a los cuales se les aplico los análisis estadísticos pertinentes, obteniendo una $p=0.000$ (apéndice X.1), por lo que hay diferencias significativas entre los dos tratamientos micorrizados, el Testigo y Ab.

Para saber si había diferencias significativas entre HMA y HMA+Ab, se realizaron los análisis estadísticos correspondientes (apéndice X.2) encontrando una $p=0.009$, la cual es menor que 0.05, por lo que se concluye que no poseen la misma colonización micorrícica estos tratamientos.

Las interacciones de micorrizas arbusculares y *Azospirillum* siguen una tendencia similar a la descrita para *Azotobacter* (Barea 1983, citado por Cordova, 1999), donde se ha reportado que esta bacteria muestra interacciones positivas con las micorrizas, en el sentido de mejorar la colonización micorrícica de la planta y de estimular su crecimiento (Ho, 1988., citado por Cordova 1999), lo cual se refleja en este estudio, al ser precisamente el tratamiento con doble inoculación (HMA+Ab) el que presenta mayor porcentaje de infección. Sin embargo, estos efectos sinérgicos parecen estar más relacionados con la producción de hormonas por parte de la bacteria, que con su capacidad de fijar nitrógeno (Harari *et al.* 1988., citado por Cordova 1999).

Para consulta de análisis estadísticos remitirse al apéndice X.1, X.2 y XI.

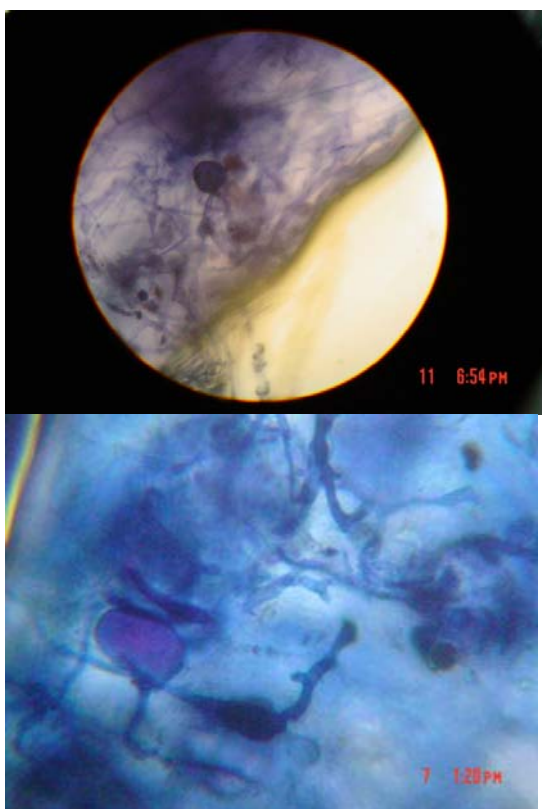


Foto 29. Hifas y vesículas arbusculares (visto al microscopio 100X)

Foto 30. Vesícula arbuscular e hifas (visto al microscopio 100X)

Número de unidades formadoras de células (UFC)

En el cuadro 13 se observa el número promedio de UFC obtenido para los tratamientos y el Testigo. Mientras que para HMA y Testigo no se encontró presencia bacteriana, en el tratamiento de *Azospirillum brasilense* (Ab) se encontraron 26600 UFC por 0.1 g de raíz, en contraste, el tratamiento de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) más *Azospirillum brasilense* obtuvo 42000 UFC por la misma cantidad de raíz.

Se procedió entonces a realizar los análisis estadísticos correspondientes.

Para poder determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos Ab y HMA+Ab se efectuó la prueba de Kruskal-Wallis, obteniendo una $p = 0.000$ (apéndice XI), lo que significa que hay diferencias significativas entre estos tratamientos.

El mayor número de colonias formadoras de células se encontró en el tratamiento que fue doblemente inoculado, lo que demuestra de nueva cuenta que existe sinergia entre los dos microorganismos empleados (Benthlenfalvay, 1996; Arroyo *et al.*, 1996., citados por Cordova, 1999) y reafirma lo encontrado en el estudio de Alarcón (2002) en relación al aumento del porcentaje de colonización micorrícica y número de UFC al encontrarse el Hongo Micorrícico Arbuscular y *A. brasilense* interactuando. Además Vázquez (2000) menciona que las poblaciones de *Azospirillum sp.*, incrementan en presencia de micorrizas, lo que a su vez concuerda con lo encontrado previamente por Pacovsky (1989., Belinov *et al.*, 1999., citados por Vázquez, 2000) en cuanto a que la supervivencia de *Azospirillum* incrementa al encontrarse en raíces de plantas micorrizadas.

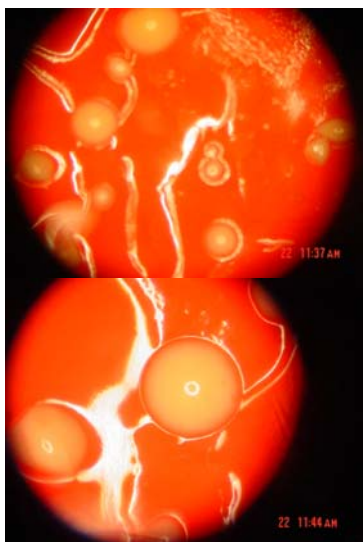


Foto 31. Colonias de *A. brasilense* para el tratamiento HMA+Ab (visto al estereoscopio 60X).

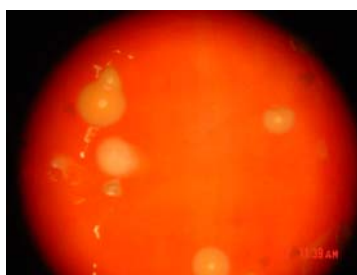


Foto 32. Colonias de *A. brasilense* para el tratamiento Ab (visto al estereoscopio 60X).

Foto 33. Colonias de *A. brasilense* (visto al estereoscopio 60X).

12. TABLA DE RESULTADOS

Parámetro		Testigo	HMA	Ab	HMA+Ab	Observaciones
% germinación	cámara de germinación	98				Las semillas germinan más rápido a 30° C constantes.
	invernadero	90				Las semillas tardan más en germinar que en la cámara de germinación.
% supervivencia		100	100	100	100	
% colonización micorrícica		0	16.2	0	28	Aumenta la colonización micorrícica al interactuar HMA y Ab. Se obtuvo una p=0.009.
Número de unidades formadoras de células (UFC)		0	0	26 600	42 000	Aumenta el número de UFC al estar presente los HMA. Se obtuvo una diferencia significativa entre Ab y HMA+Ab con una p=0.000
Evapotranspiración real (ETR) acumulada (mm)		378.453	382.456	381.3035	383.5905	La ETR fue muy similar para los tratamientos y el Testigo.
Transpiración acumulada (mm)		32.9327	35.0972	34.5767	36.7652	La transpiración fue muy similar para los tratamientos y el Testigo.
Altura		A.I.=3.518 A.F.=2.293	A.I.=3.6355 A.F.=2.2275	A.I.=3.6813 A.F.=2.2255	A.I.=3.6575 A.F.=2.9831	Se puede observar como la altura inicial (dada por los cotiledones) fue mayor a la registrada en la altura final promedio al término del experimento. A pesar de no haber diferencias significativas, el tratamiento HMA+Ab fue el que obtuvo la mayor altura promedio al final del experimento, mientras que los valores para el resto de los tratamientos y el Testigo fueron muy parecidos.
Cobertura vegetal	Cobertura máxima	D.I.=0.885 D.F.=3.602	D.I.=0.881 D.F.=4.382	D.I.=1.0085 D.F.=3.5015	D.I.=1.1285 D.F.=4.0505	La cobertura máxima final registrada fue para HMA, seguido de HMA+Ab, mientras que quedaron rezagados con valores muy parecidos Testigo y Ab.
	Cobertura mínima	D.I.=0.7185 D.F.=1.069	D.I.=0.6265 D.F.=1.5115	D.I.=0.6 D.F.=1.04	D.I.=.7357 D.F.=1.7147	La mayor cobertura mínima fue para HMA+Ab, seguido por HMA, quedando más atrás con valores muy parecidos Testigo y Ab.
Número de hojas		3.24	3.5	3.305	4.03	HMA+Ab mostró diferencias significativas respecto a los otros tratamientos y el Testigo con una p=0.024.
Tasa de crecimiento relativo		-0.00201337	-0.00223352	-0.00233317	-0.001836301	El hecho de que tengan signos negativos los resultados es debido a que las mediciones comenzaron una vez que había acabado de emerger el cotiledón que por cierto fue muy alto (como se puede observar en el gráfico de altura al

						observar en el parámetro de altura al comienzo del experimento), por lo que para el tiempo que duro el experimento, la mayoría de las plántulas no superaron la altura inicial obtenida por el cotiledón.
Biomasa aérea (g)	húmeda	1.5249	1.34342	1.16296	1.56712	Al analizar los resultados, se deja entrever que estos corresponden a la forma en que los microorganismos afectan la morfología de la planta si se asume que estos fueron debidos a los microorganismos inoculados, en caso contrario pudo ser debido a su plasticidad ecológica (ver análisis de resultados particular y general).
	seca	0.33604	0.41148	0.33638	0.37852	
Biomasa Raíz	húmeda	0.41042	0.41822	0.32262	0.42562	
	seca	0.0254	0.0386	0.02138	.03112	
Coeficiente raíz-vástago		0.07558	0.09380	0.06355	0.08221	

A.I.= altura inicial, A.F.= altura final, D.I.= diámetro inicial, D.F.= diámetro final

Las celdas en azul indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

TABLA DE RESULTADOS

Parámetro		Testigo	HMA	Ab	HMA+Ab	Observaciones
Uso eficiente del agua (g/kg H ₂ O)		0.08021	0.09988	0.07939	0.09090	No hubo diferencias significativas entre los tratamientos, pero se aprecia que tanto la planta que fue inoculada con HMA como con HMA+Ab usaron más eficientemente el agua en relación a el Testigo y Ab, cuyo valor fue muy similar al primero.
Potencial hídrico		-0.37	-0.24	-0.27	-0.14	Entre mayor es el valor, más hidratada esta la planta. HMA+Ab tubo diferencias significativas respecto a los otros tratamientos y el Testigo con una $p=0.047$.
Nitrógeno %	Tejido vegetal aéreo	0.45097853	0.52033276	0.588	0.63357055	Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas para este periodo de tiempo, se puede observar que el tratamiento con la doble inoculación tiene un mayor porcentaje de nitrógeno que el resto, seguido de Ab, HMA y el Testigo.
	raíz	0	0	0.28	0.84	Los tratamientos que contienen a <i>A. brasilense</i> son los que presentan un valor distinto a cero. El tratamiento que contiene el mayor porcentaje de nitrógeno es el tratamiento de la doble inoculación.
	suelo	0.0395	0.0349	0.0372	0.0396	Se encontró diferencias significativas entre los tratamientos y el suelo estéril con una $p=0.041$.
	suelo estéril	0.018651286				
Fósforo (mg/kg)	Tejido vegetal aéreo	0.85547007	0.66451066	0.9116346	0.61957903	El mayor contenido de fósforo correspondió al tratamiento de Ab, seguido de Testigo, HMA y HMA+Ab.
	raíz	0.07664	1.05766238	1.03519657	0.99026495	Hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el Testigo con una $P=0.028$, no encontrando lo mismo entre tratamientos.
	suelo	17.29238181	8.8226	17.8217	14.1162	Aunque aparentemente los valores parezcan ser un poco diferentes, no lo fueron lo suficiente para establecer diferencias significativas.
	suelo estéril	5.117133394				Se observa que el valor antes de comenzar el experimento está por debajo de cuando este termina, sin embargo, no hubo diferencias significativas.

Las celdas en azul indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

13. Análisis general de resultados

Los resultados obtenidos en este estudio no muestran de manera contundente la influencia que pueden tener los microorganismos aquí empleados sobre el desarrollo de la planta, ya que para poder haber llegado a dichos resultados, se debió haber llevado a cabo un periodo de experimento más largo, si bien las 32 semanas que se dejaron crecer las plantas no son pocas para un trabajo de Tesis de Licenciatura, si lo son para plantas de ciclo de vida largo como es el caso de la planta aquí empleada (*Agave salmiana* var. *salmiana*). Como se ha observado en la discusión de resultados, en la mayoría de los parámetros medidos y cuantificados no se aprecian diferencias significativas por lo anteriormente mencionado, y en aquellos casos en las que lo hubo, no se puede afirmar que fue debido solamente al efecto de los HMA, *Azospirillum brasilense* y su interacción, ya que estas diferencias pudieron ser también debidas a la plasticidad ecológica de las plantas, y no tanto a la influencia de los microorganismos empleados. Por otro lado, se sabe que las respuestas de las plantas a la inoculación de *Azospirillum brasilense* todavía tiene inconsistencias y no es predecible, las cuales son apreciables en este estudio. Por lo que solamente puedo concluir lo siguiente y dar algunas recomendaciones.

14. Conclusiones

El porcentaje de germinación de semillas de *Agave salmiana* var. *salmiana* es muy similar tanto en condiciones de invernadero como en cámara de germinación.

La supervivencia de plántulas de *Agave salmiana* no se ve afectada por la utilización de hongos micorrizógenos arbusculares, *Azospirillum brasilense*, su combinación o por la falta de alguno de estos bajo condiciones de invernadero en el lapso de duración del experimento.

La colonización micorrícica aumenta al encontrarse en presencia de *Azospirillum brasilense*.

Se obtiene un mayor número de unidades formadoras de células de *Azospirillum brasilense* al encontrarse con los Hongos Micorrícicos Arbusculares.

Los beneficios de *Azospirillum brasilense*, hongos micorrizógenos arbusculares y de su sinergia depende, entre otros factores, de la combinación bacteria-planta y de la concentración del inóculo.

15. Recomendaciones

Establecer el número de esporas óptimo del inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares a emplear, así como que especies y en que cantidad se encuentran en el inóculo.

Utilizar un cultivo monosporico de Hongos Micorrícicos Arbusculares en la inoculación, para saber de qué manera la especie empleada está influenciando a la planta y su relación con la bacteria, y saber así, específicamente qué efectos está generando.

Es importante realizar un estudio sobre es el número óptimo de Unidades Formadoras de Células (UFC) de *Azospirillum brasilense* a emplear en el inóculo.

Evaluar las respuestas de la plántula a los tratamientos durante un periodo más largo, ya que *Agave salmiana* var. *salmiana* es una especie de lento crecimiento, debido a que para el tiempo evaluado (32 semanas), no se registraron diferencias significativas para la mayor parte de los parámetros medidos y cuantificados, y para los que los hubo, pudo ser debido más a la genética de la planta que a la influencia que pudieron ejercer los microorganismos empleados.

16. Referencias

- Alarcón A., Davies Jr. Frederick T., Egilla Johnatan N., Fox Theodore C., Estrada Luna Arturo A., y Ferrera Cerrato Ronald (2002). **Short terms effects of *Glomus Claroideum* and *Azospirillum brasilense* on growth and root acid phosphatase activity of *Carica Papaya* L. under phosphorus stress.** Revista Latinoamericana de Microbiología. v.44, No. 1, pp 31-37.
- Alarcón A. y Ferrera-C. R. (2000). **Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular.** Mundi-prensa México S.A de C.V. Colegio de Postgraduados.
- Arroyo, V. A.; Martínez M. G y Sánchez M. J. (1998). **Efecto de las micorrizas vesículo arbusculares (VA) en cultivos de maíz en dos sitios del estado de México.** Universidad veracruzana. pp. 201-215.
- Azcón-G. C. y Barea J. M. (1980). **Micorrizas.** Ed. Prensa Científica. Barcelona, España. pp. 83-92.
- Barea J. M., Azcón Aguilar C., Roldan Fijardo B. (1984). **Avances recientes en el estudio de la micorriza vesícula arbuscular. Formación, funcionamiento y efectos recientes en nutrición vegetal.** Anales de edafología y agrobiología. Granada, España. pp. 659-677.
- Barea J. M., Jeffries P. (1995). **Arbuscular mycorrhizas in sustainable soils plants sistem.** pp. 521-559. In: B. Hock and A. Varma (ed). Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology. Springer Verlag, Heidelberg, Germany.
- Bashan, Y., Holguín, G, y Ferrera, R. (1996). **Interacción entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*.** Terra. 14: 159-194.
- Bashan, Y. and Levanon H. (1990). **Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture.** Can. J. Microbiol. 36: 591-608.
- Beilby J. P. y Kidby D. K. (1980). **Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* changes in neutral and polar lipids.** Journal of Lipid research 21:739-750.
- Brundrett M. C. (2002). **Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants.** New Phytologist. 134: 275-298.
- Brundrett Mark (2004). **Diversity and classification of mycorrhizal associations.** Biol Rev. 79:473-495.
- Castillo Rubio C. G. (2005). **Biodiversidad y efectividad de Hongos Micorrícicos Arbusculares en ecosistemas Agro-forestales del centro sur de Chile.** Tesis para optar al grado académico de Dr. en Ciencias de Recursos Naturales. Universidad de la Frontera. Temuco-Chile. pp. 1-113.
- Charles-Edwards D.A., Doley D. y Rimmington G. (1986). **Modelling plant growth and development.** Academic Press, Australia. p. 235.
- Cooper K. (1984). **Physiology of VA mycorrhizal associations.** In VA mycorrhiza C. L1. Powell D. Bagyaraj. Ed. CRC Boca Raton, Florida. pp. 155-203.
- Córdoba C. M. d. J. (1999). **La micorriza arbuscular y su interacción con las bacterias promotoras del crecimiento.** Colegio de postgraduados. Montecillo, Estado de México.

- Cruz U. B. S. (1999). **Micorrización en la conservación de los bosques**. Ciencia Ergo Sum, Vol. 6, No. 2. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. pp. 159-164.
- De la Garza, L. de Lara M. P. (1994). **Análisis físico de semillas en laboratorio**. En: Semillas forestales, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. División Forestal. Centro de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales. México. pp. 103-109.
- Drew A. P. (1982). **Shoot-root Plasticity and Episodic Groth in Red Pine Seedlings**. School of Forestry and Wood Products, Michigan Technological University, Houghton Michigan, U.S.A. Annals of Botany Company 49: 347-357.
- Estaún V., Savé R., Biel C. (1997). **AM Inoculation as a biological tool to improve plant revegetation of a disturbed soil with *Rosmarinus officinalis* under semi-arid conditions**. Applied Soil Ecology 6: 223-229.
- Ferrera, C. R., González C. M. C. y Rodríguez, M. M N. (1993). **Manual de agromicrobiología**. Trillas, México. pp. 53-91.
- Garcia D. M. (2007). **Estudio taxonómico de los Hongos Micorrízicos Arbusculares asociados a *Bouteloua curtipendula* en cuatro poblaciones del Valle del Mezquital, Hidalgo**. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Biólogo. FES Zaragoza. UNAM.
- Garcia T. A. (1981). **Experimentos en microbiología del suelo**. CIA Editorial Continental, S.A de C.V. México. UAM Iztapalapa. Impreso en México.
- Genderman, J. W. y Nicolson T. H. (1963). **Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting**. Transaction of the British Mycological Society 46: 235-244.
- Gianinazzi-Pearson V. y Gianinazzi S. (1983). **The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots**. Plants and soil. 7:19-29.
- Granados S. D. (1993). **Los agaves de México**. UACH. 1ª Edición en Español. Impreso en México.
- Hamp, R. y Schaeffer, C. (1999). **Mycorrhiza-Carbohydrate and energy metabolism**. En: Varma A. y Hock B. (editors). Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology. 2ª edición. Spriger, Alemania, pp. 273-303.
- Harley, L. (1989). **The Fourth Benefactor's Lecture. The significance of Mycorrhiza**. En Myco. Res. (2):92.
- Kloepper J. W., R. M. Zablotowics, E. M. Tipping y R. Lifshitz (1991). **"Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers"**. In: The rhizosphere and plant growth, editado por D.L Keister y P.B. Cregan, Kluwer academis publishers, pp 315-326.
- Kramer P. (1974). **Relaciones hídricas de suelos y plantas, una síntesis moderna**. EDUTEX, México.
- Lamb D., Parrota J., Keenan R. y Tucker N. (1997). **Rejoining habitats remnants: restoring degraded reforested lands, in tropical forest remnants**. Ecology, management, and conservation of fragmented communities. Eds. Laurance, W. F. y Bierregaard R.O. pp:366-385.

- Le Tacon F. (1985). **Las micorrizas, una cooperación entre plantas y hongos**. Mundo Científico N° 49, Vol. 5. pp. 776-784.
- Linderman R.G. (1992). **Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions**. In: Mycorrhizae in sustainable agriculture. Bethlenfalvay G. J. y Linderman R. Ed. ASA Special Publication 54, Madison, Wi. USA. pp. 45-70.
- Lugo (1986). **Solos, interpretación fisicoquímica**. Catedra de Química Xeral e Agrícola, E.U.I.T.A.
- Luna C. L. A. (2005). **Influencia de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) sobre el desarrollo de *Agave salmiana* (Agavaceae) y *Opuntia Streptacantha* (Cactaceae) en condiciones de invernadero**. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Biólogo. FES Zaragoza. UNAM.
- Manual de Procedimientos Analíticos para Análisis de Suelos y Plantas del Laboratorio de Fertilidad de Suelos**. IRENAT – Colegio de Postgraduados.
- Márquez A., Pereda V., Jiménez D., Valdés J. (2002). **Micorrizas: la faceta menos conocida de los hongos**. *Conversus*, no. 10. Instituto Politécnico Nacional.
- Michiels, K. W., Croes C.I. and Vanderleiden, J. (1991). **Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots**. *J. Gen Microbiol.* 137: 2241-2246.
- Montaño A., N. M. y Monroy A., A. (1999). **Conservación ecológica de suelos en zonas áridas y semiáridas en México**. *Ciencia y Desarrollo.* 154: 26-37.
- Nobel S. Park. (1998). **Los incomparables Agaves y Cactus**. Editorial Trillas. México. D.F. pp. 211.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000). Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
- Oda S. y Vanderleyden (2000). ***Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects**. *FEMS Microbiology reviews* 24: 487-506.
- Ortega H. H.A., Ordoñez V. C. (2006). **Hongos Micorrícicos Arbusculares de ocho localidades del Valle del Mezquital, Hidalgo**. Tesis de licenciatura para obtener el título de Biólogo. FES Zaragoza. UNAM. pp. 90.
- Paredes C. E., Carcaño M. M., Mascarua E. M. A. y Caballero M. J. (1988). **Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense***. *Rec. Lat-amer. Microbiol.* 30: 351-355.
- Peña B. J. C. (2002). **Influencia de los Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) en el establecimiento de *Mimosa biuncifera* Benth. Bajo condiciones de sequía en un invernadero**. Tesis de licenciatura para obtener el título de Biólogo. FES Zaragoza. UNAM. pp. 64.
- Pimienta-B. E., Zañudo-H. J. y García G. J. (2006). **Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana***. Universidad de Guadalajara. Departamento de Ecología. *En: Agrociencia* 40: 699-709.

- Planchette C., Fortín J. A. y Furlan V. (1983). **Growth responses of several plant species to mycorrhizal in a soil of moderate P fertility.** Plant and Soil. 70, 2:199-209.
- Ríos G. R. (1985). **Laboratorio Integral de Biología IV. Practicas del modulo de suelo. Séptimo semestre.** Universidad Nacional Autónoma de México. Escuela Nacional de Estudios Superiores Zaragoza.
- Rodríguez H., Gonzales T., Goire I., Bashan Y. (2004). **Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth –promoting bacterium *Azospirillum spp.*** Naturwissenschaften 91: 552-555.
- Rzedowski, J. (1994). **Vegetación de México.** 6ª reimpresión. Ed. Noriega Limusa. México D.F.
- Sanchez C. M. J. (2000). **Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum* y colonización con micorrizas arbusculares *in situ*, en un andisol encalado del Estado de México.** Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias.
- Siqueira J.O., Carneiro C. M.A., Curi N., Rosado da Silva S.C., Davide A.C., (1998). **Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil.** Forest Ecol. Manag. 107: 241-252.
- Skukins J. (1991). **Semi-arid Lands and Deserts, Soil Resource and Reclamation.** Department of Biology, Utah State University, Logan, Utah Marceldekker, Inc. USA.
- Smith S., Read D. (1997). **Mycorrhizal symbiosis.** Segunda Edición. Capítulo 1. Academic Press. London.
- Varela L., Estrada T. A. (1999). **El papel de los microorganismos de la rizosfera y de la micorriza en la absorción de nutrimentos minerales y agua.** Mérida Yucatan, México.
- Varela, L. y Trejo D. (2001). **Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México.** Acta Zool. Mex. Número especial, 1:39-51.
- Vázquez M. M., Cesar S., Azcón R., Barea J. M. (2000). **Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects in microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants.** Applied Soil Ecology 15: 261-272.

17. Anexos

17.1. Anexo 1

Muestra los métodos empleados para la determinación de las propiedades físicas del suelo empleado en el experimento.

Propiedad Física	Método	Bibliografía
Color	Tablas Munsell	Manual de suelos, FESZ UNAM
Densidad Aparente	Probeta	
Densidad Real	Picnómetro	
% espacio poroso		
Textura	Bouyoucos	

17.2. Anexo 2

Muestra los métodos empleados para la determinación de las propiedades químicas del suelo empleado en el experimento

Propiedad Química	Método	Bibliografía
pH	Potenciométrico	Manual de suelos, FESZ UNAM
Capacidad de Intercambio Catiónico		
Materia Orgánica	Vía húmeda de Walkey-Black	
Conductividad Eléctrica	Conductímetro	
Nitrógeno	Kjeldhal	Manual de Procedimientos Analíticos para Análisis de Suelos y Plantas del Laboratorio de Fertilidad de Suelos IRENAT –Colegio de Postgraduados
Fósforo	Olsen	

17.3. Anexo 3

Método de Olsen, para P extraíble

Principio

La solución extractora esta formada por NaHCO_3 0.5 M de pH 8.5. Bajo estas condiciones, la solubilidad del fosfato de calcio existente en los suelos calcáreos, alcalinos o neutros aumenta debido a la precipitación de Ca^{2+} como CaCO_3 . En suelos ácidos que contengan fosfatos ligados al Al y Fe, la precipitación de P en la solución incrementa conforme sube el pH. Reacciones de precipitación secundaria se reducen al mínimo debido a que la concentración de Al, Ca y Fe, se mantiene a un bajo nivel en esta solución extractora.

Reactivos

Solución extractora, bicarbonato de sodio 0.5 M. Se pesan 42 g de NaHCO_3 y se disuelven en aproximadamente 900 mL de agua. Se ajusta el pH a 8.5 con NaOH 10 N y se afora a 1 L. Se debe controlar el pH de la solución antes de utilizarla. El contacto de esta solución con el aire tiende a cambiar el pH, por lo que debe controlarse antes de utilizarse y realizar el ajuste si es preciso.

Ácido sulfúrico 17 N. Se diluyen 196 mL de H_2SO_4 concentrado (si $\rho=1.84$ g/cm³ y pureza de 95%) en agua y se afora a 500mL.

Tartrato de antimonio y potasio a 0.5%. Se pesan 0.5 g de $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y se disuelven en 100 mL de agua.

Molibdato de amonio. Se disuelven 20 g de $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ en 300 mL de agua. Se agregan lentamente, bajo constante agitación y con cuidado, 450mL de H_2SO_4 14 N. Se agregan 100mL de tartrato de antimonio y potasio a 0.5%. se diluyen las mezclas a 1 L con agua. Se guarda esta solución en frasco oscuro para protegerlo de la luz.

Solución reductora, ácido ascórbico. Se disuelven 0.50 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ con solución de molibdato de amonio y se afora con la misma solución a 100 mL. Esta solución se prepara minutos antes y cada vez que se vaya a realizar la colorimetría.

Estándar de P de 200ppm. Se disuelven 0.8786 g de fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4), secado a 105°C durante 2 h, en agua y se diluye a 1 L. se guarda en frasco de plástico o de vidrio blando para evitar contaminación con arsénico y se mantiene en refrigeración.

Estandarte p de 5ppm. Se diluyen 5mL de la solución de 200 ppm de P a 200mL con agua. Se prepara en el momento de desarrollar la colorimetría.

Material y equipo

Tubos de polipropileno de 100mL o matraz enlermeyer de 250mL

Tapones de hule y cuadros de film o película de plástico

Papel whatman 5, 42 o similar

Carbón activado

Pipetas de 5 y 10mL

Matraz aforado de 50mL

Embudos de plástico

Microbureta

Bureta de 50mL

Frascos de vidrio

Probeta de 50mL o dosificador automático

Agitador de acción reciproca

Espectrofotómetro

Procedimiento

Se pesan 2.5 g de suelo y se colocan en un matraz enlermeyer de 125 mL o en tubos de polipropileno de 100 mL (cubrir los tapones con la película de plástico para evitar contaminación). Se adicionan 50 mL de solución extractora y se agita por 30 minutos a 180 oscilaciones por minuto (opm), se colocan los tubos de polipropileno en posición horizontal y los matraces en posición vertical. Se filtra inmediatamente a través de papel filtro whatman 5, 42 u otro de calidad similar. Si los suelos son ricos en materia orgánica, se adiciona aproximadamente 1 g de carbón activado al papel filtro. Este carbón activado debe estar libre de P. Simultáneamente se corren blancos de reactivos. Para la

determinación de P se toma una alícuota de 5 mL de filtrado (ó 10 ml si la concentración es muy baja) y se coloca en un matraz aforado de 50mL, se adiciona agua, 5mL de solución reductora y se afora. Después de la adición de cada reactivo hay que agitar. Se lee en absorbancia después de 30 minutos, pero antes de 1 hora, a 882nm. Paralelamente se prepara una curva de calibración de P como se indica a continuación:

Solución P 5 ppm ^a	Solución extractable ^b mL	Agua ^c	Ácido ascórbico	Conc de P ppm
0	5 o 10	40	5	0
1	5 o 10	39	5	0.1
2	5 o 10	38	5	0.2
4	5 o 10	35	5	0.4
6	5 o 10	34	5	0.6
8	5 o 10	32	5	0.8
10	5 o 10	30	5	1.0

^a en matraz aforado de 50mL

^b según la alícuota que se tome

^c aproximadamente

Cálculos

$$P \text{ (mg/kg)} = \text{ppm en CC} \times D_m \times D_v$$

Donde:

ppm CC = partes por millón en la curva de calibración

Dm = dilución de masa (volumen de extractante/g de muestra)

Dv = dilución de volumen (aforo/alícuota)

Tabla de interpretación de fósforo, extraído por el Método Olsen (“Solos, interpretación físico-química”. Cátedra de Química Xeral e Agrícola, E.U.I.T.A.. Lugo, 1986):

FÓSFORO ASIMILABLE (ppm)	INTERPRETACIÓN
< de 5,0	Muy bajo
5,1 - 15,0	Bajo
15,1 - 30,0	Normal
30,1 - 40,0	Alto
> de 40,0	Muy alto

17.4. Anexo 4

Método Kjeldhal, nitrógeno total

Principio

La determinación de nitrógeno orgánico y amoniacal, por el método Kjeldhal, involucra dos etapas fundamentales: Digestión de la muestra para convertir el nitrógeno orgánico a formas amoniacales y la destilación de la muestra digerida.

La digestión se realiza calentando la muestra con ácido sulfúrico además de sustancias catalizadoras que aceleran y facilitan la oxidación de la materia orgánica y la conversión de nitrógeno orgánico a amonio, tales como sulfato de sodio, potasio y cobre, también se incluye en algunos casos, la adición de ácido acetil-salicílico para la inclusión de nitritos y nitratos en la determinación.

El amonio convertido durante la digestión, se determina por titulación por arrastre de vapor, recibiendo el destilado en ácido bórico y se forma así borato de amonio que se titula con un ácido de concentración conocida en presencia de un indicador que generalmente es la mezcla de verde de bromocresol-rojo de metilo.

Procedimiento

Suelo

1. Colocar 1g de suelo tamizado en una malla de 1.5mm o malla 30 en matraz kjeldhal
2. Agregar 4mL de mezcla ácido sulfúrico-salicílico
3. Después de 30' adicione mezcla catalizadora (1.1g)
4. Calentar a temperatura media alta hasta que el digestazo se torne claro
5. Ebulir la muestra por una hora. A partir de este momento, la temperatura se debe regular para que los vapores del ácido se condensen en el tercio interior del cuello del matraz

Terminada esta etapa

6. Se deja enfriar, se agrega suficiente agua destilada (15 mL pueden ser suficientes) para colocar en suspensión mediante agitación, el digestazo
7. Dejar decantar las partículas de sílice evitando precipitación de cristales de NH_4SO_4 transferir el equipo de destilación y agregar 15mL de NaOH al 50%
8. Se procede a la destilación. Se recibe el destilado en 20mL de ácido bórico al 4% y 0.2mL de mezcla de indicador verde de bromocresol-rojo de metilo y llevar hasta un volumen aproximadamente de 50mL

Planta

1. Pesar 0.1 g de material vegetal molido y seco y colocar en matraz kjeldhal
2. Agregar 0.1 g de mezcla de sulfatos
3. Adicione 1.5 mL de ácido sulfúrico-salicílico de modo que el material vegetal entre en contacto íntimo con la mezcla ácida
4. Digerir a temperatura no mayor a 360 °C
5. Después de que la solución ha tomado una coloración verde clara (aspecto acuoso), continuar calentando 1 hora más aproximadamente
6. Al finalizar la digestión enfríe y agregue 10mL de agua destilada

7. Transfiera a equipo de destilar cuantitativamente adicionando 14mL de NaOH al 50% e inicie el calentamiento
8. El destilado se recibe en 20 mL de solución de ácido bórico al 4% mas 0.2mL de indicador verde de bromocresol-rojo de metilo hasta alcanzar un volumen aproximadamente de 50mL
9. La titulación se lleva a cabo con ácido sulfúrico 0.05 N hasta que aparezca un tono levemente rosado

Tabla de interpretación del nitrógeno total en tanto por ciento, (“Solos, interpretación fisico-química”. Cátedra de Química Xeral e Agrícola, E.U.I.T.A.. Lugo, 1986):

NITRÓGENO TOTAL (%)	INTERPRETACIÓN
0,05	Muy bajo
0,06-0,10	Bajo
0,11 -0,20	Normal
0,21-0,30	Alto
0,30	Muy alto

18. Apéndice

Análisis estadísticos para diversos datos:

I. Tasa de crecimiento

Tests of Normality

Variable	Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
altura	Testigo	.084	20	.200*	.959	20	.520
	HMA	.205	20	.027	.931	20	.165
	Ab	.111	20	.200*	.970	20	.752
	HMA+Ab	.123	20	.200*	.967	20	.696
cobmax	Testigo	.122	20	.200*	.948	20	.339
	HMA	.174	20	.113	.933	20	.176
	Ab	.111	20	.200*	.970	20	.758
	HMA+Ab	.203	20	.031	.786	20	.001
cobmín	Testigo	.136	20	.200*	.922	20	.107
	HMA	.155	20	.200*	.863	20	.009
	Ab	.119	20	.200*	.976	20	.881
	HMA+Ab	.118	20	.200*	.916	20	.084

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-wallis

Ranks

Variable	Tratamiento	N	Mean Rank
altura	Testigo	20	42.75
	HMA	20	39.28
	Ab	20	35.50
	HMA+Ab	20	44.48
	Total	80	
cobmax	Testigo	20	45.25
	HMA	20	47.80
	Ab	20	34.53
	HMA+Ab	20	34.43
	Total	80	
cobmín	Testigo	20	35.48
	HMA	20	42.85
	Ab	20	36.78
	HMA+Ab	20	46.90
	Total	80	

Test Statistics^{a,b}

	altura	cobmax	cobmín
Chi-Square	1.754	5.499	3.171
df	3	3	3
Asymp. Sig.	.625	.139	.366

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Tratamiento

II. Altura, cobertura máxima, mínima, y número de hojas al comienzo y final del experimento.

II.I Análisis para datos al comienzo del experimento

Tests of Normality^{b,c,d}

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
altura	Testigo	.130	20	.200*	.953	20	.407
	HMA	.123	20	.200*	.954	20	.433
	Ab	.115	19	.200*	.937	19	.232
	HMA+Ab	.159	20	.200*	.951	20	.383
cobmax	Testigo	.129	20	.200*	.919	20	.093
	HMA	.160	20	.190	.913	20	.072
	Ab	.133	19	.200*	.933	19	.199
	HMA+Ab	.151	20	.200*	.917	20	.086
cobmin	Testigo	.184	20	.076	.855	20	.006
	HMA	.284	20	.000	.770	20	.000
	Ab	.223	19	.014	.819	19	.002
	HMA+Ab	.206	20	.026	.888	20	.024
hojas	Ab	.538	19	.000	.244	19	.000

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

b. hojas is constant when tratamiento = Testigo. It has been omitted.

c. hojas is constant when tratamiento = HMA. It has been omitted.

d. hojas is constant when tratamiento = HMA+Ab. It has been omitted.

Kruskal-wallis

Ranks

tratamiento	N	Mean Rank	
altura	Testigo	20	36.83
	HMA	20	40.25
	Ab	20	43.70
	HMA+Ab	20	41.23
	Total	80	
cobmax	Testigo	20	31.60
	HMA	20	34.10
	Ab	20	45.20
	HMA+Ab	20	51.10
	Total	80	
cobmin	Testigo	20	40.33
	HMA	20	36.40
	Ab	19	37.55
	HMA+Ab	20	45.60
	Total	79	
hojas	Testigo	20	40.00
	HMA	20	40.00
	Ab	20	42.00
	HMA+Ab	20	40.00
	Total	80	

Test Statistics^{a,b}

	altura	cobmax	cobmin	hojas
Chi-Square	.902	9.435	1.909	3.000
df	3	3	3	3
Asymp. Sig.	.825	.024	.592	.392

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tratamiento

II.2 Análisis para datos al final del experimento

Tests of Normality

tratamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
altura	testigo	.197	20	.041	.944	20	.282
	HMA	.204	20	.029	.846	20	.005
	Ab	.166	20	.150	.947	20	.319
	HMA+Ab	.225	20	.009	.851	20	.006
cobmax	testigo	.082	20	.200*	.987	20	.989
	HMA	.300	20	.000	.629	20	.000
	Ab	.096	20	.200*	.980	20	.929
	HMA+Ab	.393	20	.000	.499	20	.000
cobmin	testigo	.364	20	.000	.584	20	.000
	HMA	.428	20	.000	.333	20	.000
	Ab	.226	20	.009	.871	20	.012
	HMA+Ab	.346	20	.000	.533	20	.000
hojas	testigo	.358	20	.000	.761	20	.000
	HMA	.442	20	.000	.513	20	.000
	Ab	.435	20	.000	.520	20	.000
	HMA+Ab	.329	20	.000	.765	20	.000

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-wallis

Ranks

tratamiento	N	Mean Rank
altura	testigo	41.55
	HMA	37.08
	Ab	38.43
	HMA+Ab	44.95
	Total	80
cobmax	testigo	38.98
	HMA	49.83
	Ab	34.50
	HMA+Ab	38.70
	Total	80
cobmin	testigo	33.60
	HMA	43.45
	Ab	36.33
	HMA+Ab	48.63
	Total	80
hojas	testigo	34.78
	HMA	36.98
	Ab	36.58
	HMA+Ab	53.68
	Total	80

Test Statistics^{a,b}

	altura	cobmax	cobmin	hojas
Chi-Square	1.372	4.762	5.181	9.421
df	3	3	3	3
Asymp. Sig.	.712	.190	.159	.024

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tratamiento

III. Evapotranspiración y transpiración acumulada por semana

Tratamiento

Case Processing Summary

Tratamiento	Cases						
	Valid		Missing		Total		
	N	Percent	N	Percent	N	Percent	
ETRacumuladapor semana	testigo	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
	HMA	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
	Ab	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
	HMAb	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
Transpiraciónacumuladapor semana	testigo	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
	HMA	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
	Ab	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
	HMAb	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%

Tests of Normality

Tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
ETRacumuladapor semana	testigo	.100	32	.200*	.929	32	.036
	HMA	.110	32	.200*	.928	32	.035
	Ab	.103	32	.200*	.927	32	.032
	HMAb	.101	32	.200*	.927	32	.033
Transpiraciónacumuladapor semana	testigo	.100	32	.200*	.943	32	.092
	HMA	.150	32	.063	.943	32	.089
	Ab	.115	32	.200*	.944	32	.100
	HMAb	.116	32	.200*	.943	32	.089

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Tratamiento	N	Mean Rank
ETRacumuladapor semana	testigo	63.13
	HMA	64.47
	Ab	65.19
	HMAb	65.22
	Total	128
Transpiraciónacumuladapor semana	testigo	58.91
	HMA	69.69
	Ab	62.41
	HMAb	67.00
	Total	128

Test Statistics^{a,b}

	ETRacumulad aporsemana	Transpiraci ^ó nacumulada porsemana
Chi-Square	.067	1.601
df	3	3
Asymp. Sig.	.995	.659

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Tratamiento

III.1 Transpiración por semana

Explore

Case Processing Summary

		Cases					
		Valid		Missing		Total	
transpiraci ^ó porsemana	tratamiento	N	Percent	N	Percent	N	Percent
	testigo	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
	HMA	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
	Ab	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%
	HMAb	32	100.0%	0	.0%	32	100.0%

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
transpiraci ^ó porsemana	testigo	.179	32	.011	.834	32	.000
	HMA	.155	32	.048	.921	32	.023
	Ab	.166	32	.025	.836	32	.000
	HMAb	.198	32	.003	.873	32	.001

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

ANOVA

transpiraci ^ó porsemana					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.374	3	7.791	.087	.967
Within Groups	11125.341	124	89.720		
Total	11148.715	127			

IV. Potencial hídrico

Tratamiento

Case Processing Summary

tratamiento	Cases						
	Valid		Missing		Total		
	N	Percent	N	Percent	N	Percent	
pothídrico	Testigo	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMA	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMA+Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

Tests of Normality

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
pothídrico	Testigo	.341	5	.059	.830	5	.140
	HMA	.473	5	.001	.552	5	.000
	Ab	.239	5	.200*	.902	5	.419
	HMA+Ab	.473	5	.001	.552	5	.000

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Ranks

tratamiento	N	Mean Rank	
pothídrico	Testigo	5	15.00
	HMA	5	11.60
	Ab	5	10.60
	HMA+Ab	5	4.80
	Total	20	

Test Statistics^{a,b}

	pothídrico
Chi-Square	7.935
df	3
Asymp. Sig.	.047

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tratamiento

V. Nitrógeno y Fósforo en tejido vegetal entre tratamientos y Testigo

Explore

Case Processing Summary

Tratamiento		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Nitrogenoraiz	Testigo	3	60.0%	2	40.0%	5	100.0%
	HMA	4	80.0%	1	20.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
Fosforoaereo	Testigo	3	60.0%	2	40.0%	5	100.0%
	HMA	4	80.0%	1	20.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
Fosfororaiz	Testigo	3	60.0%	2	40.0%	5	100.0%
	HMA	4	80.0%	1	20.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
Nitrogenoaereo	Testigo	3	60.0%	2	40.0%	5	100.0%
	HMA	4	80.0%	1	20.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

Tests of Normality^{b,c}

Tratamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Nitrogenoraiz	Ab	.473	5	.001	.552	5	.000
	HMAb	.367	5	.026	.684	5	.006
Fosforoaereo	Testigo	.276	3	.	.942	3	.537
	HMA	.323	4	.	.888	4	.373
	Ab	.250	5	.200*	.927	5	.578
	HMAb	.268	5	.200*	.806	5	.090
Fosfororaiz	Testigo	.385	3	.	.750	3	.000
	HMA	.221	4	.	.956	4	.755
	Ab	.167	5	.200*	.974	5	.902
	HMAb	.266	5	.200*	.871	5	.268
Nitrogenoaereo	Testigo	.378	3	.	.768	3	.039
	HMA	.204	4	.	.963	4	.801
	Ab	.348	5	.047	.779	5	.054
	HMAb	.289	5	.200*	.849	5	.191

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

b. Nitrogenoraiz is constant when Tratamiento = Testigo. It has been omitted.

c. Nitrogenoraiz is constant when Tratamiento = HMA. It has been omitted.

Oneway

ANOVA

Nitrogenoraiz

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.269	3	.756	2.895	.070
Within Groups	3.920	15	.261		
Total	6.189	18			

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Tratamiento	N	Mean Rank
Nitrogenoaereo	Testigo	5	8.20
	HMA	4	8.13
	Ab	5	12.00
	HMAb	5	11.30
	Total	19	
Fosforoaereo	Testigo	3	10.83
	HMA	5	8.80
	Ab	5	11.10
	HMAb	5	7.80
	Total	18	
Fosfororaiz	Testigo	4	2.50
	HMA	5	12.40
	Ab	5	12.10
	HMAb	5	11.50
	Total	19	

Test Statistics^{a,b}

	Nitrogeno aereo	Fosforoaereo	Fosfororaiz
Chi-Square	1.866	1.239	9.098
df	3	3	3
Asymp. Sig.	.601	.744	.028

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Tratamiento

V.1. Fósforo entre tratamientos

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Tratamiento	N	Mean Rank
Fosfororaiz	HMA	5	8.40
	Ab	5	8.10
	HMAb	5	7.50
	Total	15	

Test Statistics^{a,b}

	Fosfororaiz
Chi-Square	.106
df	2
Asymp. Sig.	.949

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Tratamiento

VI. Fósforo entre suelo estéril y tratamientos

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
fósforo1	9	60.0%	6	40.0%	15	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
fósforo1	.173	9	.200*	.978	9	.953

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	tratamientos	N	Mean Rank
fósforo1	sueloesteril	2	1.50
	testigo	1	7.00
	HMA	1	3.00
	Ab	3	7.67
	HMAb	2	4.50
	Total	9	

Test Statistics^{a,b}

	fósforo1
Chi-Square	7.305
df	4
Asymp. Sig.	.121

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tratamientos

VI.1 Fósforo entre tratamientos

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
fósforo	7	58.3%	5	41.7%	12	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
fósforo	.184	7	.200*	.959	7	.813

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Ranks

tratamiento	N	Mean Rank
fósforo testigo	1	5.00
HMA	1	1.00
Ab	3	5.67
HMAb	2	2.50
Total	7	

Test Statistics^{a,b}

	fósforo
Chi-Square	4.982
df	3
Asymp. Sig.	.173

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tratamiento

VI.2. Nitrógeno entre suelo estéril y los tratamientos

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
nitrógeno	15	100.0%	0	.0%	15	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nitrógeno	.239	15	.021	.880	15	.047

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

ANOVA

nitrógeno

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	4	.000	3.757	.041
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.002	14			

VI.3. Nitrógeno entre tratamientos

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
nitrogeno1	12	80.0%	3	20.0%	15	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nitrogeno1	.286	12	.008	.866	12	.059

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	tratamiento1	N	Mean Rank
nitrogeno1	1.00	3	6.00
	2.00	3	7.00
	3.00	3	6.00
	4.00	3	7.00
	Total	12	

Test Statistics^{a,b}

	nitrogeno1
Chi-Square	.232
df	3
Asymp. Sig.	.972

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tratamiento1

VII. Biomasa aérea y seca de raíz, vástago y peso total**Tratamientos**

Case Processing Summary

Tratamientos	Cases						
	Valid		Missing		Total		
	N	Percent	N	Percent	N	Percent	
biomasahumedaraz	tesigo	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMA	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
biomasahumedaereo	tesigo	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMA	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
biomasasecaraz	tesigo	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMA	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
biomasasecaereo	tesigo	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMA	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
biomasatotal	tesigo	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMA	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

Tests of Normality

Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
biomasahumedaraiz	tesigo	.271	5	.200*	.924	5	.555
	HMA	.186	5	.200*	.938	5	.655
	Ab	.311	5	.128	.879	5	.306
	HMAb	.218	5	.200*	.931	5	.603
biomasahumedaereo	tesigo	.187	5	.200*	.962	5	.823
	HMA	.202	5	.200*	.909	5	.461
	Ab	.208	5	.200*	.911	5	.476
	HMAb	.224	5	.200*	.914	5	.492
biomasasecaraiz	tesigo	.410	5	.006	.651	5	.003
	HMA	.408	5	.007	.726	5	.018
	Ab	.445	5	.002	.622	5	.001
	HMAb	.183	5	.200*	.945	5	.700
biomasasecaereo	tesigo	.256	5	.200*	.943	5	.687
	HMA	.216	5	.200*	.902	5	.421
	Ab	.318	5	.111	.832	5	.144
	HMAb	.228	5	.200*	.868	5	.260
biomasatotal	tesigo	.124	5	.200*	.994	5	.991
	HMA	.217	5	.200*	.957	5	.784
	Ab	.183	5	.200*	.970	5	.875
	HMAb	.227	5	.200*	.919	5	.521

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Tratamientos	N	Mean Rank
biomasahumedaraiz	tesigo	11.20
	HMA	11.40
	Ab	8.20
	HMAb	11.20
	Total	20
biomasahumedaereo	tesigo	12.20
	HMA	10.40
	Ab	7.20
	HMAb	12.20
	Total	20
biomasasecaraiz	tesigo	10.60
	HMA	12.60
	Ab	8.40
	HMAb	10.40
	Total	20
biomasasecaereo	tesigo	11.20
	HMA	11.20
	Ab	8.80
	HMAb	10.80
	Total	20
biomasatotal	tesigo	12.20
	HMA	10.20
	Ab	7.40
	HMAb	12.20
	Total	20

Test Statistics^{a,b}

	biomasahumedaraiz	biomasahumedaereo	biomasasecaraiz	biomasasecaereo	biomasatotal
Chi-Square	1.011	2.383	1.263	.566	2.211
df	3	3	3	3	3
Asymp. Sig.	.798	.497	.738	.904	.530

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Tratamientos

VIII. Uso eficiente del agua (WUE)

Explore

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Tratamiento	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Tratamiento	.169	20	.139	.863	20	.009

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

ANOVA

WUE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	3	.000	.095	.962
Within Groups	.046	16	.003		
Total	.047	19			

IX. Coeficiente raíz/vástago

Explore

Tratamientos

Case Processing Summary

Tratamientos	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
coeficienterootshoot						
tesigo	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
HMA	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
Ab	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

Tests of Normality

Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
coeficienterootshoot						
tesigo	.316	5	.115	.822	5	.122
HMA	.326	5	.088	.760	5	.036
Ab	.387	5	.014	.720	5	.015
HMAb	.434	5	.002	.632	5	.002

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

ANOVA

coeficienterootshoot					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.119	3	.040	1.015	.412
Within Groups	.626	16	.039		
Total	.745	19			

X. Cálculos del porcentaje de colonización micorrízica

Colonización micorrízica para el tratamiento HMA

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{16}{100} \times 100 = 16$$

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{13}{100} \times 100 = 13$$

100

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{18}{100} \times 100 = 18$$

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{15}{100} \times 100 = 15$$

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{19}{100} \times 100 = 19$$

Promedio del % de colonización micorrízica = 16.2

Colonización micorrízica para el tratamiento HMA+Ab

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{29}{100} \times 100 = 29$$

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{26}{100} \times 100 = 26$$

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{26}{100} \times 100 = 26$$

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{31}{100} \times 100 = 31$$

$$\% \text{ de colonización micorrízica} = \frac{28}{100} \times 100 = 28$$

Promedio del % de colonización micorrízica = 28

X.1. Análisis estadísticos para colonización micorrízica para todos los tratamientos y el Testigo

Explore

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
ColMic	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ColMic	.317	20	.000	.790	20	.001

a. Lilliefors Significance Correction

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Ranks

Tratamiento	N	Mean Rank
ColMic Testigo	5	5.50
HMA	5	13.00
Ab	5	5.50
HMAb	5	18.00
Total	20	

Test Statistics^{a,b}

	ColMic
Chi-Square	18.363
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Tratamiento

X.2. Análisis de datos para colonización micorrícica entre HMA y HMA+Ab

Case Processing Summary

	tratamiento	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Colmic	HMA	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
	HMAb	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

Tests of Normality

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Colmic HMA	.175	5	.200*	.974	5	.899
HMAb	.227	5	.200*	.910	5	.468

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Test Statistics^{a,b}

	Colmic
Chi-Square	6.860
df	1
Asymp. Sig.	.009

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tratamiento

XI. Número de Unidades Formadoras de Célula (UFC)

Case Processing Summary

tratamiento	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
UFC Ab	15	100.0%	0	.0%	15	100.0%
HMAb	15	100.0%	0	.0%	15	100.0%

Tests of Normality

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
UFC Ab	.248	15	.014	.910	15	.133
HMAb	.300	15	.001	.804	15	.004

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal-Wallis Test

Ranks

tratamiento	N	Mean Rank
UFC Ab	15	8.00
HMAb	15	23.00
Total	30	

Test Statistics^{a,b}

	UFC
Chi-Square	22.194
df	1
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tratamiento