



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**Establecimiento de plantas de mezquite (*Prosopis laevigata*)
inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares y *Rhizobium etli*
en condiciones de invernadero**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA
PRESENTA:**

Peña Espinosa Alejandra

**Director de tesis: Dr. Arcadio Monroy Ata
Unidad de investigación en ecología vegetal**

**Investigación realizada con financiamiento de la Dirección General de Asuntos
del Personal Académico (UNAM), mediante el proyecto PAPIIT IN218317**



CIUDAD DE MÉXICO, junio de 2017



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

Al **Dr. Arcadio Monroy Ata**, gracias por todo el apoyo que me brindo para la culminación de este trabajo, por ser excelente profesor, pero sobre todo por ser una excelente persona siempre, así como a la **Biól. Yolanda flores** por todos los consejos y la ayuda brindada durante mi estancia en la unidad de ecología vegetal de la FES-Zaragoza.

A mis sinodales

Dr. Rosalva García Sánchez por su ayuda y asesoría con la técnica de tinción Gram y sus valiosas sugerencias y aportaciones a este trabajo.

Dr. María Socorro Orozco Almanza por sus valiosos consejos para el control de plagas así como sus recomendaciones para mejorar la presentación de este trabajo.

Dr. Esther Matiana García Amador por el tiempo invertido en este trabajo así como sus recomendaciones y observaciones sobre el trabajo.

Biól. Marco Antonio Hernández Muñoz por todas sus atinadas observaciones sobre el trabajo, las cuales ayudaron a enriquecer y mejorar este trabajo.

A mi padre **Jorge Peña Orta** por siempre creer y confiar en mí, por inculcarme el amor y respeto a la naturaleza, por ser mi enciclopedia humana e inspirarme de todas las formas posibles con tu ejemplo, porque aunque no pudiste estar en la culminación de mis estudios físicamente eres parte de mí y siempre estás conmigo, gracias por ser el mejor papá del mundo.

A mi madre **Rosa María Espinosa Rodríguez** porque siempre has estado y estás conmigo, desde el inicio de esta travesía, por siempre cuidar de mí, por todos tus desvelos, por todo tu amor, por recorrer conmigo toda la ciudad y esperar horas y horas interminables a que presentara mis exámenes de admisión, además de apoyarme durante toda mi carrera, gracias por creer y confiar en mi brindándome siempre tu apoyo, este logro también es tuyo, eres la mejor mamá del mundo.

A toda mi familia en particular a mi abuelo **Antonio Espinosa García** y mi hermana **Estefany Peña Espinosa**, por apoyarme para poder terminar mi carrera.

A mi novio **Dante Granados Carranza**, porque siempre estás ahí conmigo en las buenas y en las malas dándome todo tu amor y tu apoyo, regalándome tus sonrisas y tu amor, no puedo terminar de agradecerte todo lo que siempre haces por mí, te amo con todo mi corazón.

A todos los amigos que me han apoyado de alguna manera, en particular a **Melissa** por ser la mejor twina del universo y estar siempre conmigo, a **Ivonne** y **David** por ayudarme esos días de calor infernal con las mediciones para terminar más rápido y no morir de un golpe de calor, por todo su apoyo y por tantos buenos momentos.

Dedico este trabajo:

*A mis padres Rosa María Espinosa Rodríguez y Jorge Peña Orta por todo
su amor y apoyo.*

*“Todo lo que yo invento, todo lo que yo imagino, quedará siempre más acá
de la verdad, porque llegará un momento en que las creaciones de la
ciencia superarán a las de la imaginación”.*

- Julio Verne

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen.....	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1. Zonas áridas y semiáridas en México	3
3.2. Interacción planta-microorganismos	5
3.3. Ciclo del nitrógeno	5
3.4. Fijación biológica del nitrógeno (FBN)	6
3.5. <i>Rhizobium etli</i>	7
3.6. Interacción <i>Rhizobium etli</i> -planta	7
3.7. Micorrizas	8
3.8. Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)	9
3.9. Clasificación taxonómica de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)	10
3.10. Clasificación de <i>Prosopis laevigata</i> (mezquite)	12
3.11. Descripción general	12
3.12. Origen y distribución	13
3.13. Importancia económica y usos	13
4. Justificación	14
5. Problemática	15
6. Hipótesis	16
7. Objetivos	16
7.1. Objetivo general	16
7.2. Objetivos particulares	16
8. Metodología	16
8.1. Trabajo de campo	17
8.2. Trabajo de Invernadero	18
8.2.1. Esterilización de suelo y capacidad de campo	18
8.2.2. Preparación de las macetas	18
8.2.3. Germinación de semillas	18
8.3. Trabajo de laboratorio	19
8.3.1. Procedencia de los inóculos	19
8.3.2. Inoculación y trasplante	19
8.3.3. Mediciones	20

8.3.4. Diseño estadístico	20
8.3.5. Supervivencia	20
8.3.6. Cobertura	21
8.3.7. Tasa de crecimiento relativo (TCR)	21
8.3.8. Biomasa húmeda, seca y cociente raíz/vástago (R/V)	21
8.3.9. Evapotranspiración real (ETR)	23
8.3.10. Eficiencia del uso del agua (EUA)	23
8.3.11. Porcentaje de colonización micorrízica	24
8.3.12. Extracción de esporas	25
8.3.13 Determinación de <i>Rhizobium etli</i>	26
9. Resultados y discusión	27
9.1. Germinación de semillas	27
9.2. Supervivencia	28
9.3. Altura máxima	28
9.4. Cobertura	30
9.5. Número de pinnas	31
9.6. TCR.....	31
9.7. Eficiencia del uso del agua	32
9.8. Biomasa húmeda del vástago y la raíz	33
9.9. Evapotranspiración real (ETR)	34
9.10. Cociente raíz/vástago (R/V)	34
9.11. Porcentaje de colonización micorrízica	35
9.12. Conteo de esporas	37
9.13. Determinación de la presencia de <i>Rhizobium etli</i>	37
10. Conclusiones	40
11. Referencias	41

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de las zonas áridas y semiáridas de México	4
Figura 2. Diferentes tipos de colonización por HMA	11
Figura 3. <i>Prosopis laevigata</i>	12
Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología del proyecto	17
Figura 5. Empaque de biofertilizante comercial de <i>Rhizobium etli</i> , Biofábrica siglo XXI	19

Figura 6. Plántulas de mezquite	20
Figura 7. Peso húmedo de vástago y raíz de <i>Prosopis laevigata</i>	22
Figura 8. Montaje de raicillas para observar en microscopio y determinar el porcentaje de colonización micorrízica	24
Figura 9. Motor eléctrico para la dispersión de agregados.....	25
Figura 10. Solución de sacarosa al 50%.....	25
Figura 11 Observación de la tinción Gram a 100x	26
Figura 12 Inicio de la germinación	27
Figura 13 Emergencia de radículas.....	27
Figura 14 Emergencia de cotiledones	27
Figura 15 Porcentaje de supervivencia final en plantas de <i>Prosopis laevigata</i>	29
Figura 16 Comparación de la altura de los tratamientos a través del tiempo.....	29
Figura 17 Comparación de la altura final entre tratamientos.....	29
Figura 18 Comparación de la cobertura semanal en cada tratamiento obtenida a través de 180 días de observación	30
Figura 19 Cobertura final por tratamiento, A) HMA B) <i>Rhizobium etli</i> C) HMA+Re D) Testigo	30
Figura 20 Comparación por tratamiento de número de pinnas el día 168.....	31
Figura 21 TCR de los tratamientos aplicados a <i>P. laevigata</i>	32
Figura 22 Eficiencia del uso del agua en <i>Prosopis laevigata</i>	32
Figura 23 Peso húmedo de la raíz de los tratamientos aplicados a <i>P. laevigata</i>	33
Figura 24 Peso húmedo de raíz de los tratamientos aplicados a <i>P. laevigata</i>	33
Figura 25 Evapotranspiración real de los tratamientos aplicados a <i>P. laevigata</i>	34
Figura 26 Cociente Raíz/Vástago de los tratamientos aplicados.	35
Figura 27 Porcentaje de colonización micorrízica radical	36
Figura 28 Vesículas e hifas	36
Figura 29 Conteo de número de esporas por cada 100 g de sustrato	37
Figura 30 Tinción Gram de las raíces del grupo testigo. Fotografía tomada a 100x.....	37
Figura 31 Tinción Gram de las raíces del tratamiento inoculado con <i>Rhizobium etli</i> . Fotografía tomada a 100x.	38
Figura 32. Tinción Gram de las raíces del tratamiento HMA+Re. Fotografía tomada a 100x.....	38

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los HMA.....	12
Tabla 2. Tabla de resultados.....	37

1. Resumen

En México las zonas áridas y semiáridas presentan deterioro en su cubierta vegetal, debido esencialmente a actividades antropogénicas, las cuales alteran la dinámica de procesos ecológicos y biológicos importantes para el funcionamiento de los ecosistemas. Un factor importante para la supervivencia de la vegetación de las zonas áridas y semiáridas son las interacciones mutualistas tales como las relaciones planta-hongos micorrizógenos arbusculares y las relaciones entre plantas y bacterias fijadoras de nitrógeno, las cuales aportan beneficios a la planta hospedera aumentando su índice de supervivencia, mayor aprovechamiento de agua, mayor resistencia ante sequías y patógenos, etc. Así, el presente estudio tuvo como finalidad determinar el desarrollo y el establecimiento de plantas de *Prosopis laevigata* inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares y la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium etli*, bajo condiciones de invernadero y cultivadas durante un periodo de seis meses. Para esto se utilizaron lotes de 30 macetas por tratamiento, de las cuales 30 fueron inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), 30 inoculadas con *Rhizobium etli* (Re), 30 inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares y *Rhizobium etli* (HMA+Re) y 30 macetas sirvieron como control (T), además de cinco macetas sin planta que funcionaron como testigo de la evaporación de agua en el sustrato.

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en la supervivencia, la cobertura y la evapotranspiración a favor del tratamiento con HMA, así como una diferencia significativa en la altura máxima, el número de pinnas, el cociente raíz/vástago y la tasa de crecimiento relativa a favor del tratamiento de *Rhizobium etli*. También se obtuvo una diferencia significativa en cuanto al uso eficiente del agua, biomasa húmeda del vástago y la raíz y colonización micorrízica, a favor del tratamiento de HMA+Re. Por lo anterior, se concluye que los tratamientos ejercen un efecto favorable para la supervivencia, altura, cobertura, número de pinnas, TCR, cociente R/V, uso eficiente del agua, evapotranspiración y biomasa húmeda de las plantas de *P. laevigata* debido a resultados significativamente mayores en comparación con el grupo testigo, por lo cual se recomienda que los programas de rehabilitación de la vegetación de matorrales xerófilos que utilicen mezquite en sus mosaicos de plantas, propaguen *Prosopis laevigata* con doble inoculación (HMA+Re) para favorecer su establecimiento.

2. Introducción

La importancia que tiene la restauración ambiental se deriva de la existencia generalizada de distintas formas de degradación de los recursos naturales y las condiciones ambientales que tienen su manifestación en aspectos tales como la pérdida de vegetación y suelos, cuerpos de agua eutrofizados, contaminación atmosférica, pérdida de recursos genéticos, pérdida o destrucción de partes vitales de hábitat, erosión genética, mortalidad y baja reproducción de las especies, cambios climáticos, geológicos y ecológicos de la especie y en general, el deterioro progresivo de distintos tipos de sistemas: naturales, modificados, cultivados y construidos. En general las distintas actividades humanas se han extendido hasta alcanzar las fronteras de los territorios en estado natural, en tanto que las acciones de conservación se han centrado en la preservación del hábitat natural subsistente (WRI, UICN, PNUMA, 1992). En América Latina y el Caribe y a nivel se busca incluir, dentro de los sistemas de áreas protegidas, muestras representativas de la diversidad natural de una región (Machlis, 1993). Esto en parte debido a que resulta más rentable proteger los hábitats naturales ya existentes, que restaurar los que ya han sido degradados.

El crecimiento demográfico humano ha sido el principal motor de presión sobre los recursos naturales, y esto debido a que, para satisfacer las necesidades poblacionales, cada día más grandes, ha sido necesario expoliar los ecosistemas. Así mismo, para abastecer la creciente demanda de alimentos, ha sido necesario sembrar cada vez mayores superficies de tierra, ello a costa de afectar terrenos que anteriormente ocupaban bosques, selvas, humedales o matorrales. Se calcula que aproximadamente 24% de la superficie terrestre está ocupada hoy día por tierras de cultivo y que tan sólo cuatro gramíneas (cebada, maíz, trigo y arroz) ocupan cerca de 40% de la superficie agrícola total. De igual modo, para el abastecimiento de carne, leche y pieles se han transformado áreas con flora y fauna silvestre en zonas para la cría del ganado, contabilizando éstas, en la actualidad, entre 6 y 8% de la superficie terrestre del planeta.

A medida que se reduce la disponibilidad de tierras agropecuarias o para darles la condición de áreas protegidas, por la presión de la población y las necesidades de producción y a medida que aumenta la superficie de tierras degradadas, se vuelve una necesidad la adopción generalizada de técnicas de restauración de la tierra (WRI, UICN, PNUMA, 1992; Lamprecht, 1990). No obstante, las tierras degradadas no son la única dimensión que requiere de la atención de las acciones de restauración.

La restauración ecológica es un concepto más amplio que implica un conjunto de técnicas y procedimientos que busca de manera integral la restauración de sistemas ecológicos con diferentes intensidades de deterioro.

En términos generales restauración se refiere a reparar, arreglar o traer de nuevo a su estado primitivo algún bien que se encuentra deteriorado, devolviéndole su forma o estado originales (Webster's New Collegiate Dictionary, 1977). En particular, la restauración ecológica se refiere al proceso de recuperar integralmente un ecosistema que se encuentra parcial o totalmente degradado, en cuanto a su estructura vegetal, composición de especies, funcionalidad y autosuficiencia, hasta llevarlo a condiciones semejantes a las presentadas originalmente (Meffe y Carroll, 1996), sin dejar de considerar que se trata de sistemas dinámicos que se encuentran influenciados por factores externos y que provocan que las características anteriores varíen dentro de un rango a lo largo del tiempo (Parker y Pickett, 1997). Esta estrategia busca asistir el recubrimiento vegetal y el manejo de la integridad biológica, que incluye un rango crítico de variabilidad en biodiversidad, procesos ecológicos y estructuras, en el contexto regional e histórico, y en las prácticas culturales sostenibles.

Existen tres formas básicas de restaurar un área degradada (Machlis, 1993):

- Recuperarla: volviendo a cubrir de vegetación la tierra con especies apropiadas,
- Rehabilitarla: Usando una mezcla de especies nativas y exóticas para recuperar el área, y
- Restaurarla: Restableciendo en el lugar el conjunto original de plantas y animales con aproximadamente las mismas poblaciones que antes.

3. Marco teórico

3.1. Zonas áridas y semiáridas en México

Las zonas áridas y semiáridas ocupan aproximadamente 50-60% de la superficie del país (INEGI, 1999), lo que las convierte en el más vasto de todos los tipos de vegetación de México, ya que cubren un extenso territorio (Fig.1) el cual abarca desde la península de Baja California, así como grandes extensiones de la planicie costera y las montañas bajas de Sonora, la casi totalidad del estado de Coahuila y Nuevo León, parte de Tamaulipas, la mayor parte de los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, la región noreste de Guanajuato, Aguascalientes y gran parte de Querétaro, así como los estados de Hidalgo, Puebla, hasta una pequeña porción de Oaxaca (CONAZA, 1994). Se consideran

zonas áridas, aquellas áreas que reciben una precipitación pluvial media anual menor a 350 mm y semiáridas a las que reciben entre 350 y 600 mm anuales. En ambos casos, la precipitación promedio anual es menor a la evaporación potencial máxima anual poniendo en evidencia un déficit hídrico. La vegetación de zonas áridas y semiáridas presenta grandes variaciones. Predominan las formas de vida arbustiva, con plantas bajas, leñosas y muy ramificadas desde la base; su composición florística varía de acuerdo con las características microclimáticas, topográficas, sustrato geológico y condiciones edáficas de las diversas localidades.

Durante miles de años, las áreas conocidas como Aridoamérica fueron habitadas por grupos nativos aislados y poco numerosos, que practicaban estrategias de subsistencia de bajo impacto ecológico, ya que vivían de la caza y la recolección, con pocas actividades agrícolas. Sin embargo, la situación cambió radicalmente en los últimos 100 años, pues los matorrales y pastizales xerófilos fueron sometidos a un intenso sobrepastoreo, debido a la introducción del ganado bovino y en especial del ganado ovino (Challenger, 1998). De manera simultánea se inicia o se acelera la sobreexplotación selectiva de algunas especies de plantas, propias del matorral xerófilo tales como la lechuguilla y la candelilla en el norte del desierto Chihuahuense, alterando la estructura y diversidad de sus comunidades.

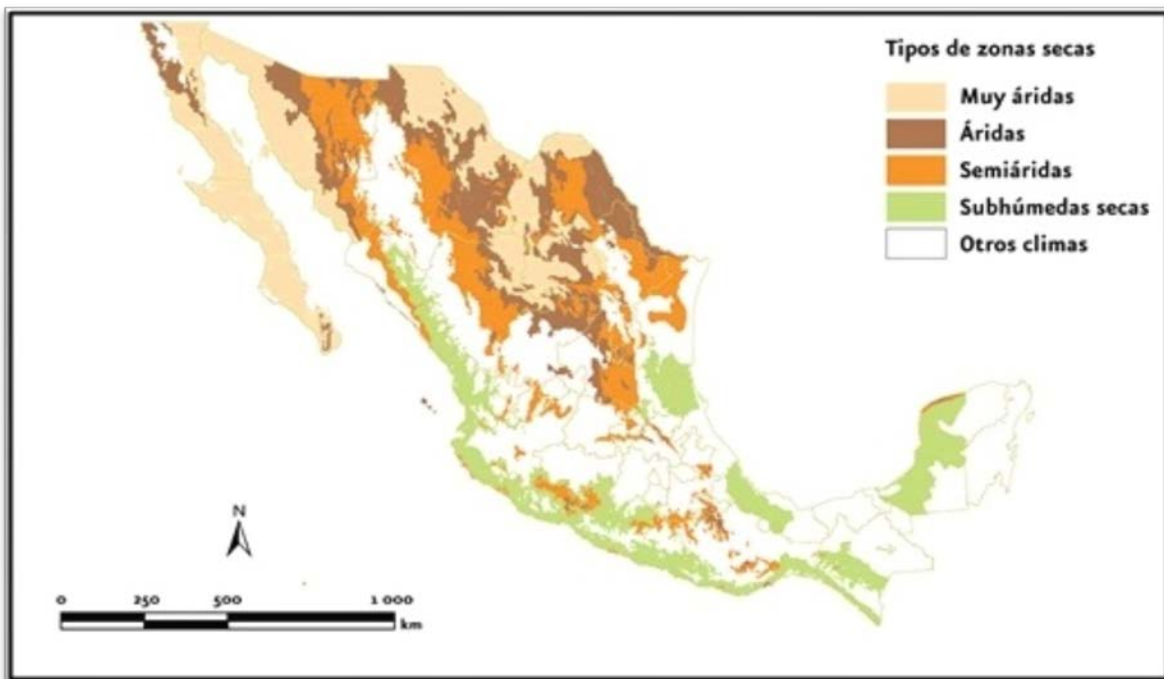


Figura 1. Distribución de las zonas áridas y semiáridas de México. Fuente: UACH (2011).

3.2. Interacción planta-microorganismos

Las interacciones entre los microorganismos y las raíces de las plantas se basan en la modificación del ambiente del suelo por procesos como: captación de agua, liberación de compuestos orgánicos al suelo por las raíces, producción (por parte de los microorganismos) de factores de crecimiento y captación de minerales (Souchie *et al.*, 2006). La diversidad de los microorganismos presentes en el suelo depende de diversos factores como la composición química, textura, disponibilidad de agua, entre otras características que intervienen en la disponibilidad de nutrimentos, así como la tensión de oxígeno en las diferentes partículas que conforman el suelo (Mahmood, 2006). Todas las plantas presentan un sistema microbiano asociado a sus raíces y éste es responsable del establecimiento, supervivencia y productividad de la planta. Dentro de estas interacciones, las más ampliamente estudiadas es la interacción leguminosa-*Rhizobium*, ya que esta asociación se basa en un reconocimiento mutuo de los dos organismos compatibles, cimentado en una respuesta quimiotáctica y una unión específica a las estructuras radicales. La asociación se caracteriza por el desarrollo de nódulos simbióticos fijadores de nitrógeno (Minamisawa *et al.*, 2004).

En cuanto a los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), se caracterizan porque el hongo que coloniza la raíz desarrolla una estructura en forma de árbol en las células del parénquima radical, estructura llamada "arbusculo" que es el sitio de intercambio entre la planta y el hongo. Además, el sistema micorrizico está formado por un conjunto de hifas (micelio) que están conectadas con el tejido de la raíz y que salen de ella ramificándose en el suelo. El micelio que se encuentra en el suelo forma una red de hifas capaces de interconectar a las raíces de plantas y permitir el flujo de agua y nutrimentos entre las raíces (Montaño *et al.*, 2007).

3.3. Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno constituye aproximadamente el 78% de la composición de la atmósfera (Behar *et al.*, 2005). El nitrógeno es un elemento fundamental para el desarrollo de la vida, ya que forma parte de las macromoléculas, de forma tal que la productividad de cualquier ecosistema está relacionada con la disponibilidad de nitrógeno (Ferrera *et al.*, 1995), ya que se presenta frecuentemente como limitante del crecimiento vegetal pues es eliminado del suelo en cantidades superiores al resto de los nutrientes (Frioni, 1990), por lo que la productividad de los ecosistemas se relaciona con la disponibilidad de minerales nitrogenados (Zhang *et al.*, 2007).

La conversión en los diferentes estados de oxidación del nitrógeno es principalmente por procesos biológicos (Deslippe y Egger, 2006). Se puede describir brevemente el ciclo del nitrógeno de la siguiente manera: el nitrógeno atmosférico se fija por miembros del dominio Archaea y Bacteriae, que lo reducen a formas asimilables (NH_3) para el resto de los organismos; este elemento se mantiene reducido dentro de la célula, pero al morir los microorganismos, éste se libera y se oxida a nitrato (NO_3), que en condiciones anóxicas se desnitrifica y regresa a la forma molecular (N_2). A través de este ciclo participan diversos grupos bacterianos. La nitrificación es un proceso aerobio estricto, quimiolitotrófico y se encuentra restringido a un pequeño grupo de bacterias: proteobacterias (Kowalchuck y Stephen 2001). Por otra parte, la desnitrificación es un proceso heterótrofo facultativo ocurre en bajas tensiones de oxígeno y es restringida a miembros de la familia Bacteriae y Archaea (Zhang *et al.*, 2007).

3.4. Fijación biológica del nitrógeno (FBN)

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es el proceso por el cual algunos microorganismos utilizan el nitrógeno contenido en el aire, reduciéndolo a amoníaco a través de una enzima llamada nitrogenasa para la producción de proteínas. Los microorganismos fijadores de nitrógeno son bacterias y cianobacterias, de vida libre en el suelo, eventualmente asociados a una planta, o viviendo en simbiosis con una planta. Se ha reconocido que las subfamilias Papilionáceas, Mimosáceas y Cesalpináceas poseen la propiedad de aprovechar el nitrógeno mediante la fijación biológica (Paredes, 2013).

La familia botánica de las Papilionáceas son las que presentan mayor número de especies formadoras de nódulos: entre un 80 – 90%, las Mimosáceas un 25% y las Cesalpináceas sólo unas pocas. Entre las tres subfamilias agrupan 12000 especies con capacidad fijadora de nitrógeno. En la atmósfera, el nitrógeno se encuentra en forma molecular (N_2) con una disponibilidad del 78%. Como se ha comentado anteriormente, las plantas solamente pueden asimilar el nitrógeno mayormente en forma de nitratos (NO_3) y en forma de amonio (NH_4^+). Para poder convertir el nitrógeno de su forma no asimilable (N_2) por las plantas a una que sí lo sea, las bacterias realizan la FBN. La energía requerida por las bacterias para desarrollar este proceso proviene de los carbohidratos del suelo, cuando los microorganismos son de vida libre, los exudados radicales para aquellos asociados en la rizósfera y directamente de los productos de la fotosíntesis de la planta hospedera cuando existe una simbiosis.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo; la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa (Zehr *et al.*, 1998). Dichas bacterias comprenden organismos fotótrofos, como bacterias pertenecientes a la familia Rhodospirillaceae, Clorobiaceae y Cyanobacteriae; organismos quimioautótrofos, como bacterias de los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y *Desulfovibrio* y organismos heterótrofos como las bacterias pertenecientes a la familia Frankiaceae, al grupo Rhizobiaceae y a los géneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (Sprent y Sprent, 1990). Estos organismos pueden realizar la fijación biológica de nitrógeno, ya sea independientemente (a excepción de las rizobiáceas) o estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos.

Así mismo, se estima que este proceso contribuye entre el 60-80% de la fijación biológica de nitrógeno. La simbiosis es inhibida si existe un exceso de nitrato o amonio en el suelo. En esta simbiosis, en los nódulos, la planta hospedera obtiene nutrimentos nitrogenados de las bacterias (rizobios) y ofrece a éstas una fuente de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno. Esta simbiosis contribuye con una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos (Wang *et al.*, 2001).

3.5. *Rhizobium etli*

Son organismos de vida libre que habitan en la rizosfera; es una de las muchas bacterias del suelo capaz de vivir en condiciones de limitación de nitrógeno debido a su capacidad distintiva de asentarse en nódulos de raíces de leguminosas (Dunn, 1995). Al igual que otros rizobios, se caracteriza por ser aeróbico, Gram negativo y capaz de formar una relación simbiótica con las leguminosas. Estas bacterias se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. La estimulación directa puede incluir la producción de hormonas, disolución y mineralización de fosfatos, fijación asimbiótica de nitrógeno atmosférico y producción de sideróforos y antibióticos (Santillana, 2005). En concreto, *Rhizobium etli* es la bacteria predominante asociada a leguminosas (Aguilar, 2004).

3.6. Interacción *Rhizobium etli*-planta

Rhizobium etli es una bacteria del suelo que interactúa con la raíz de las leguminosas. Esta bacteria forma una estructura especializada llamada nódulo en la raíz de la planta. La membrana celular de la planta rodea a los bacteroides en los nódulos, para formar una membrana peribacteroidal (Calderón, 2005). En este punto, el microbio vivo libre se ha movido del suelo a un ambiente de bajo pH que contiene ciertos compuestos de carbono y nitrógeno, así como el estrés oxidativo (Moris, 2005). En las células de las plantas, es funcional perdiendo su capacidad para someterse a la división celular, y también cambiando su metabolismo centrado en la fijación de nitrógeno. La simbiosis es un proceso rápido, que es crítico para permitir que el organismo colonice las raíces de la planta. Para dar una idea general de su importancia, la planta se beneficia obteniendo nitrógeno en forma de amoníaco de las bacterias, mientras que la bacteria se beneficia obteniendo carbono y nutrientes de la planta (Krishnan, 2007).

3.7. Micorrizas

El término micorriza fue acuñado por el botánico alemán Albert Bernard Frank en 1885, y procede del griego *mykos* que significa hongo y del latín *rhiza* que significa raíz, es decir, que literalmente quiere decir "hongo-raíz", definiendo así la asociación simbiótica, o mutualista, entre el micelio de un hongo y las raíces o rizoides de una planta.

Las micorrizas son uno de los tipos de simbiosis más abundante de la biosfera, que mejoran la absorción de agua y nutrientes de la raíz, permitiendo que colonicen los suelos más pobres. La historia de las micorrizas, se remonta a unos 400 millones de años, especialmente al período Devónico, a partir del cual las plantas acuáticas con la ayuda de las micorrizas, consiguieron colonizar el medio terrestre hasta lo que son hoy en día (Barea y Azcon-Aguilar, 1983). Aparece en Briofitos, en Hepáticas, en Pteridófitos, en todos los grupos de Gimnospermas y en la mayoría de Angiospermas. No están presentes en algunas familias de Angiospermas en las que han desarrollado resistencia, como: Ciperáceas, Juncáceas, Cariofiláceas o Crucíferas (Harley y Harley, 1987).

Los hongos micorrizógenos arbusculares establecen una asociación mutualista con las raíces de las plantas formando las micorrizas arbusculares (MA). En esta asociación, el hongo ofrece un beneficio a su hospedero a cambio de recibir carbohidratos, es decir, hay un beneficio mutuo producto de un

intercambio bidireccional “hongo-planta”: la planta suministra al hongo fuentes de carbono procedentes de la fotosíntesis (proceso que el hongo no puede realizar) y le brinda un hábitat en las células corticales de la raíz; mientras que el hongo le facilita a la planta la absorción de agua y nutrimentos como fósforo y nitrógeno, recursos del suelo que en condiciones extremas la planta difícilmente obtendría eficientemente sin la ayuda del hongo.

Las micorrizas bien podrían representar el segundo componente más grande en biomasa en muchos ecosistemas terrestres; asimismo, se ha encontrado que los HMA asociados con las plantas, reciben entre el 10% y el 20% del carbono de los árboles, pudiendo ser un sumidero importante del carbono de la comunidad (Montaño *et al.*, 2007).

Esta asociación se presenta en aproximadamente el 90% de las plantas, por lo que se ubica en todos los ecosistemas del mundo y, por lo tanto, en diferentes gradientes latitudinales. Además, es importante destacar que existen hongos que pueden encontrarse en varios tipos de suelo y climas, teniendo un patrón de distribución mundial, el cual indica que son, aparentemente, funcionales en diversos hábitats; no obstante, los factores físicos y químicos del suelo pueden restringir su distribución (Finlay, 2008)

El efecto más importante en las plantas es un incremento en la absorción de nutrimentos minerales del suelo (Reyes-Quintanar, 2000). Así mismo, el papel de la simbiosis es fundamental en la captación de elementos minerales de difusión lenta en el suelo, como el fosfato, el zinc y el cobre (Marschner, 2002). También, los HMA incrementan la tolerancia a la sequía (Cui y Nobel, 1992) y se vuelven necesarios para el crecimiento y supervivencia de las plantas en zonas áridas y semiáridas, debido a que la simbiosis provee a la planta de agua extraída del suelo a través de hifas extra radicales, que actúan como una extensión natural del sistema radical de la planta (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000).

3.8. Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)

Los HMA forman estructuras en las raíces de la planta hospedera tales como hifas, arbuscúlos y vesículas, mientras que en la parte extra radical incluyen hifas y esporas. Los arbuscúlos son estructuras intrincadas, con zonas que contienen carbono, agua y minerales que son transferidos a la

planta y el hongo (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1998). Además, se ha demostrado que las plantas micorrizadas tienen mayor tolerancia a metales tóxicos, patógenos de la raíz, sequía, altas temperaturas, salinidad, pH desfavorable del suelo y al choque por trasplante que sufren las plantas no micorrizadas (Mosse *et al.*, 1981). Los HMA han sido registrados en ecosistemas naturales como desiertos, dunas de arena, selvas tropicales, salinas y sistemas manejados como praderas, huertos y cultivos agrícolas (Brundrett, 1991).

En esta segunda década del siglo XXI, se conocen algunos servicios que brindan los HMA en los ecosistemas y en la agricultura, tales como la formación de suelo (disolución de rocas, enlace de partículas, etc.), fertilización del sustrato, estructuración de la comunidad vegetal (interacción planta-planta), producción secundaria (como fuente de alimento; *e.g.* esporas consumidas por nemátodos), modificación de contaminantes edáficos y el almacenamiento de carbono mediante glomalinas (proteína sintetizadas por los HMA). Por su efecto sobre las plantas de interés agrícola o forestal, los HMA se usan como inoculantes de aplicación práctica en la agricultura y en programas de reforestación de los bosques.

3.9. Clasificación taxonómica de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)

La clasificación de los hongos micorrizógenos es morfológica y se basa en el sitio que ocupa el micelio fúngico en su asociación con la raíz de la planta. Los tipos de micorriza se dividen en tres grupos principales (Fig.2): ectomicorriza, ectoendomicorriza y endomicorriza, con sus respectivas subdivisiones (Hernández *et al.*, 2003).

1. Ectomicorriza: (del griego *ecto*: del exterior) 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. De este manto parte una red micelar externa más o menos desarrolla, que se extiende por el suelo, y una red micelar interna que penetra a la raíz, pero sin entrar en el interior de las células. Los hongos involucrados son: Zygomycetos, Ascomycetos, Basidiomicetos, y Deuteromicetes.

2. Ectendomicorriza: presenta manto fúngico laxo, red de Hartig y penetración intracelular escasa. Existen subdivisiones:

A) Arbutoide: el hongo forma un manto fúngico, red de Hartig e hifas intracelulares e intercelulares. Estos hongos son pertenecientes a los Ascomycetes y Basidiomicetes y colonizan miembros del orden Ericales.

B) Monotropoide: el hongo forma un manto fúngico, hifas intracelulares e intercelulares y haustorios. Estos hongos pertenecen a los Ascomicetes y Basidiomicetes y colonizan al género *Monotropia*.

3.- Endomicorriza: el micelio invade la raíz; inicialmente es intercelular, pero luego penetra las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales. Generalmente no se observa un crecimiento denso de hifas en la superficie de la raíz, no hay un manto. Sin embargo, presenta una red micelial interna.

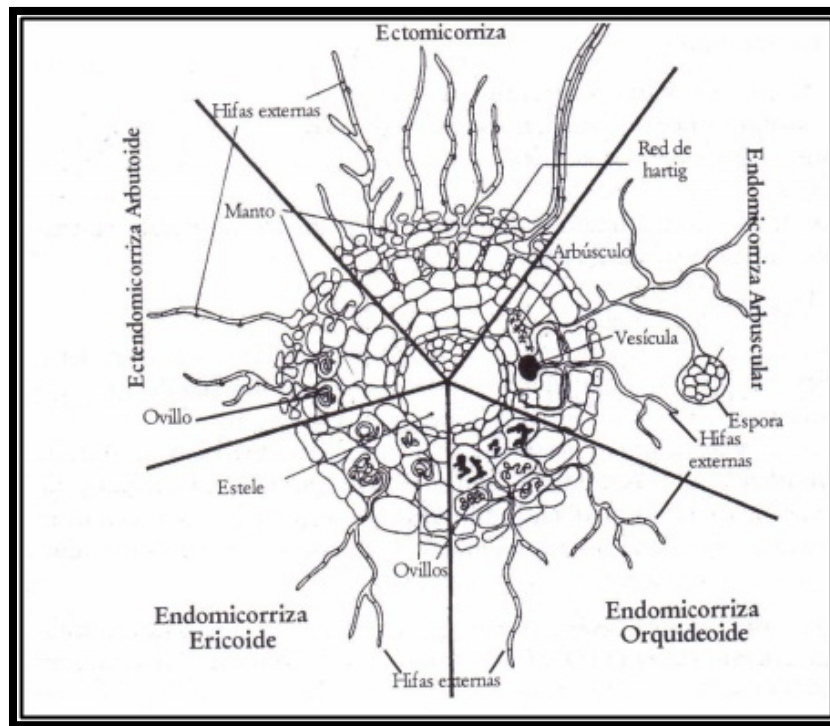


Figura 2. Diferentes tipos de colonización por HMA. Tomado de Hernández *et al.* (2003).

A su vez las endomicorizas se subdividen en tres tipos:

A) Orquideoide: el hongo penetra intracelularmente e intercelularmente y forma enrollamientos hifales. Estos hongos pertenecen a los Basidiomicetes y Deuteromicetes y colonizan a la familia Orchidaceae.

B) Ericoide: el hongo penetra intracelular e intercelularmente y forma enrollamientos hifales. Estos hongos pertenecen a los Ascomicetes y Basidiomicetes y colonizan a miembros del orden Ericales.

C) Arbuscular: el hongo penetra intracelularmente e intercelularmente y forma arbuscúlos. Estos hongos pertenecen al *phylum* Glomeromycota.

Todos los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), pertenecen al *phylum* Glomeromycota (Tabla 1) que contiene más de 200 especies dentro de los géneros *Glomus* (Glomaceae), *Acaulospora* y *Entrophosphora* (Acaulosporaceae), *Gigaspora*, *Scutellospora* (Gigasporaceae). El grupo más grande y mejor investigado, es el género *Glomus*, representado por 79 especies (Schübler *et al.*, 2001).

Tabla 1. Clasificación de los HMA (Schüßler *et al.*, 2001).

Clase glomeromycetes		
Orden	Familia	Género
Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i> , <i>Scutellospora</i>
	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> , <i>Kuklospora</i>
	Entrophosporaceae	<i>Entrophospora</i>
	Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
Diversisporales	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>
Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
Archeasporales	Archeosporaceae	<i>Archaespora</i> , <i>Intraspora</i>

3.10. Clasificación de *Prosopis laevigata* (mezquite)

Según (Rzedowski, 2001) y (Zomlefer, 2001)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Rutanae

Orden: Fabales

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Mimosaceae

Género: *Prosopis*

Especie: *Prosopis laevigata* (Fig.3)



Figura 3. *Prosopis laevigata*. Tomada de: <http://agronom.blogs.mx/2014/11>

3.11. Descripción general

Prosopis laevigata es un árbol o arbusto, a veces hasta de 12 m de altura, aunque generalmente menor; tronco hasta de 1 m de diámetro, por lo general de 30 a 60 cm, corteza gruesa, de color café-negruzco, algo fisurada; copa más ancha que alta; ramas glabras o pilosas, armadas de espinas estipulares de 1 a 4 cm de largo; hojas pecioladas, con 1 a 3 pares de pinnas, cada una con 10 a 20 pares de foliolos sésiles, oblongos o linear-oblongo, de 5 a 15 mm de largo por 1 a 2 mm de ancho, ápice obtuso, margen entero, base obtusa, glabros o ligeramente pubescentes; flores dispuestas en espigas densas de 5 a 10 cm de largo; flores blanco-amarillentas, sésiles o casi sésiles; cáliz de 1 mm

de largo, glabro o puberulento; corola de 2.5 a 3 mm de largo, pétalos agudos, tomentulosos en el margen y en el interior, estambres de 4 a 5 mm de largo; legumbre linear, algo falcada, de 7 a 20 cm de largo por 8 a 15 mm de ancho, comprimida, glabra, de color café amarillento, a veces rojizo, algo constreñida entre las semillas; éstas oblongas, comprimidas, de 8 a 10 mm de largo, de color blanco-amarillento. Se encuentra en el fondo del Valle de México y en las laderas bajas, entre 2250 y 2400 m de altitud en sitios con pastizal y matorral. Se ha colectado en la Sierra de Guadalupe y en la delegación de Xochimilco. Fuera de la región de estudio se conoce de Durango, San Luis Potosí y Tamaulipas a Oaxaca (Rzedowski, 2001).

3.12. Origen y distribución

Los estados de la República Mexicana que destacan por su producción forestal de mezquite son: Sonora, San Luis Potosí, Tamaulipas, Guanajuato, Zacatecas, Durango, Coahuila y Nuevo León. De menor importancia son los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Chihuahua, Jalisco, Oaxaca, Querétaro y Sinaloa. Su origen fitogeográfico se ubica en África donde persiste como una sola especie: *Prosopis africana*, con características poco especializadas (Dávila, 1983).

A nivel mundial existen 44 especies del género *Prosopis*, 42 de las cuales se encuentran en el continente americano, distribuidas en dos grandes centros: el norteamericano (mexicano-texano) y el suramericano (argentino- paraguayo-chileno). El complejo norteamericano, de acuerdo con Rzedowski (1988), cuenta con 9 especies, una con 2 variedades, todas ellas presentes en México y su distribución geográfica es muy amplia. Las especies más comunes son: *Prosopis juliflora*, *P. palmeri* (palo fierro), *P. laevigata*, *P. glandulosa* y *P. pubescens*.

3.13. Importancia económica y usos

El mezquite es un recurso biótico con amplia distribución geográfica y ecológica en el semidesierto mexicano. Para las etnias nómadas precolombinas fue y sigue siendo muy útil. Lo utilizan como fuente de alimento, combustible y uso medicinal. En la actualidad se le considera con potencial como forraje, material de construcción y combustible; sus comunidades proporcionan sitios para recreación humana, refugio de fauna silvestre, fuente de néctar para abejas y otros insectos; es importante también en la retención del suelo, ya que previene el proceso de desertificación. Su cultivo y mejoramiento han sido recomendados por varios autores, toda vez que hay una amplia variabilidad genética específica las

poblaciones naturales de mezquite; en la producción forestal, la madera es fuerte y durable para la fabricación de muebles, puertas, ventanas, pisos, objetos decorativos, artesanías y excelente como leña y carbón. Por otra parte, bajo ciertas condiciones son fuente de forraje para el ganado doméstico y fauna silvestre; además, las flores producen polen y néctar para la producción de miel y cera en las explotaciones apícolas; la planta excreta una goma de uso medicinal e industrial, la cual puede sustituir a la goma arábiga obtenida del género *Acacia* (Cervantes, 2002).

4. Justificación

México es el tercer país en extensión territorial de América Latina, después de Brasil y Argentina, y el segundo por su población, que asciende a 117 millones de habitantes. Sus zonas áridas y semiáridas abarcan aproximadamente la mitad de su territorio. Asimismo, los distintos tipos de matorral xerófilo y los pastizales semidesérticos, típicamente integran la vegetación de las zonas áridas y semiáridas del norte del país. Durante la colonia con la introducción del ganado, empezó un gran impacto debido, sobre todo, al pastoreo descontrolado de los primeros rebaños de animales escapados del cautiverio. Además, las especies maderables como el mezquite fueron aprovechadas de manera poco racional como una fuente de leña y energía en las haciendas (Ezcurra y Montaña, 1988).

Así mismo la explotación irracional y desmedida de que ha sido objeto, ha conducido a la degradación acelerada de las comunidades de mezquite, que se ha reflejado, no sólo en la pérdida del recurso en sí, sino que se ha agravado con el mayor deterioro de los suelos; afectación de las aguas subterráneas de las cuencas hidrológicas respectivas; estos fenómenos han conducido a la alteración del equilibrio ecológico de los frágiles ecosistemas mezquital. En consecuencia, resulta imprescindible tener a disposición mayor conocimiento para la aplicación de técnicas que permitan su establecimiento exitoso para una futura reintroducción.

Por otra parte, los HMA han sido utilizados como inóculo de plantas para lograr su establecimiento en condiciones naturales, siendo especialmente útiles en prácticas de restauración ambiental de ecosistemas degradados. Las plantas micorrizadas tienen mayor tolerancia a patógenos de la raíz, sequía, salinidad, pH desfavorable del suelo y al choque por trasplante (Mosse *et al.*, 1981).

Finalmente se puede agregar que, una vez cubiertas las necesidades de agua en las plantas, el factor limitante más importante es el nitrógeno. La mayoría de los organismos son incapaces de metabolizar el nitrógeno molecular, de modo que tiene que ser transformado en compuestos metabolizables por las plantas. Así mismo, las bacterias que viven libres en el suelo o en simbiosis con plantas son esenciales para fijar el nitrógeno, tanto nitratos como amonio, estas bacterias toman directamente el nitrógeno del aire, originando compuestos susceptibles de incorporarse a la composición del suelo o de los seres vivos. De esta forma el nitrógeno atmosférico empieza el ciclo, al ser incorporado a la planta (Calvo, 2011). En la naturaleza rara vez se tienen simbiosis con un solo tipo de microorganismo, por lo cual es importante conformar simbiosis que puedan resolver problemas limitantes como lo es en este caso el agua y el nitrógeno para asegurar el éxito de las plantas que se quieren establecer.

5. Problemática

México presenta en la mayoría de su territorio zonas áridas y semiáridas, las cuales se han visto afectadas por la pérdida de su cubierta vegetal. Esto se debe principalmente a actividades humanas tales como la sobre-explotación de algunas especies vegetales (Montaño, 2000).

Así mismo las zonas áridas y semiáridas se caracterizan por la escasez de agua y lluvias de tipo torrencial, que propician el arrastre de grandes cantidades de suelo, dejando una alta erosión; el suelo perdido es el de las capas más fértiles, lo que conlleva a su degradación y a la pérdida de su capacidad productiva, por lo cual es importante realizar investigación enfocada a brindar información que pueda ser utilizada para la restauración de este tipo de zonas.

En este trabajo se plantó responder las siguientes preguntas:

- ¿Cuál es el efecto de los tratamientos de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), *Rhizobium etli* (Re) y hongos micorrizógenos arbusculares + *Rhizobium etli* (HMA+Re) sobre la supervivencia, altura, cobertura y la tasa de crecimiento relativo (TCR) en plantas de *P. laevigata* en condiciones de invernadero, durante un periodo de 6 meses?

- ¿Qué influencia tiene la inoculación con hongos micorrizógenos arbusculares, *Rhizobium etli* y una doble inoculación de hongos micorrizógenos arbusculares + *Rhizobium etli* (HMA+Re) en plantas de *P. laevigata* sobre su eficiencia en el uso de agua, el cociente raíz / vástago y la evapotranspiración real después de 6 meses de cultivo en invernadero?
- ¿Cuál será el porcentaje de colonización micorrízica cuando está presente *Rhizobium etli* en *Prosopis laevigata*?

6. Hipótesis

Si a las plantas de *Prosopis laevigata* se les aplica un inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), *Rhizobium etli* (Re), así como un inóculo de ambos al mismo tiempo (HMA+Re), entonces desarrollarán una simbiosis mutualista planta-HMA y planta-Re, por lo cual se espera que las plantas inoculadas tengan mayor biomasa vegetal, un incremento en la supervivencia, evapotranspiración, cociente raíz/vástago y eficiencia de uso de agua.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Determinar el efecto sobre el desarrollo vegetal en plantas de mezquite (*Prosopis laevigata*) debido a la inoculación de hongos micorrizógenos arbusculares y de *Rhizobium etli* en condiciones de invernadero.

7.2. Objetivos particulares

Durante seis meses de cultivo:

- Registrar el efecto de los hongos micorrizógenos arbusculares y *Rhizobium etli* sobre la cobertura, número de pinnas y altura.
- Determinar la supervivencia de las plantas inoculadas y las no inoculadas con *Rhizobium etli*, HMA, HMA+Re y el grupo testigo.

Al final de seis meses de cultivo:

- Calcular el uso eficiente del agua, la tasa de crecimiento relativo, la biomasa húmeda y seca, el cociente R/V, la evapotranspiración real, el porcentaje de colonización micorrízica y el número de esporas por 100 g de suelo.

8. Metodología

El trabajo se dividirá en tres partes: trabajo de campo, de invernadero y de laboratorio (Fig.4).

8.1. Trabajo de campo

Se realizó una salida a campo al Valle del Mezquital, Hidalgo, para recolectar suelo y semillas de *Prosopis laevigata*. Las semillas de *P. laevigata* se recolectaron al azar, provenientes de individuos sanos, libres de plagas y con abundancia de frutos, el suelo se recolectó en un agostadero semiárido de la zona de estudio

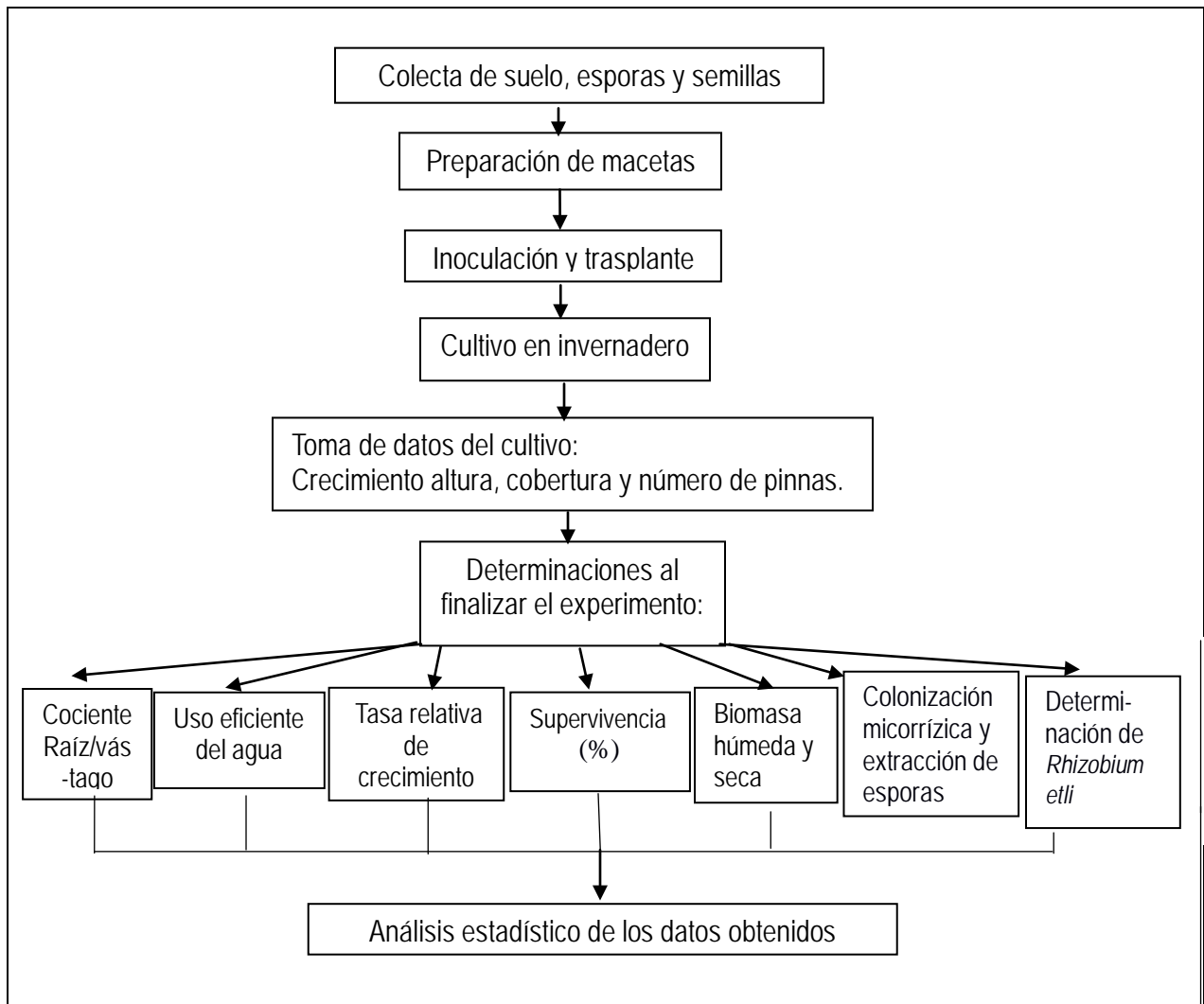


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología del proyecto.

8.2. Trabajo de Invernadero

8.2.1. Esterilización de suelo y capacidad de campo

Para la esterilización de suelo se utilizó una mezcla de suelo previamente tamizado y mezclado con arena sílica en una proporción de 1:2 (v/v), el cual se colocó en cantidad de 1kg dentro de bolsas de plástico cerradas, las cuales se introdujeron dentro de una autoclave a vapor durante dos horas a 110°C y a 15 libras de presión por pulgada cuadrada (lb/in²), (Este procedimiento se realizó tres veces). Las bolsas con suelo se sacaron y se dejaron airear por 48 horas antes de su utilización.

La capacidad de campo se entiende como contenido de humedad que alcanza el suelo cuando no puede absorber más agua de forma natural de la lluvia. Se considera entonces que el suelo ha alcanzado la capacidad de campo. Este dato puede ser muy variable incluso en el mismo suelo a lo largo del tiempo. La capacidad de campo de esta mezcla se obtuvo de la siguiente manera (Palmer y Troeh, 1979.):

$$\% \text{ de H}_2\text{O a capacidad de campo} = [(B-A) - (C-A) / (C-A)] \times 100$$

Donde:

A= peso de la cápsula

B= peso de la cápsula más suelo húmedo

C= peso de la cápsula más suelo seco al horno

8.2.2. Preparación de las macetas

Se lavaron y etiquetaron 120 macetas hechas con tubos de PVC. Se eligió este material por ser resistente y reciclable, se conformaron cuatro lotes de 30 macetas para cada uno de los cuatro tratamientos, hongos micorrizógenos arbusculares, *Rhizobium etli*, hongos micorrizógenos arbusculares/*Rhizobium etli* (B+M) y el testigo.

8.2.3. Germinación de semillas

Se germinaron 120 semillas colocándolas en cajas de plástico con una cama de algodón humedecido con agua y recubierta por papel filtro, las semillas se escarificaron previamente con una incisión cerca del micrópilo y en condiciones de invernadero, una vez que germinaron y presentaron una altura aproximada de 5 cm, se colocaron en las macetas con el suelo inoculado.

Para la germinación se aplicó un tratamiento pre-germinativo, mediante escarificación mecánica, utilizando un bisturí y sumergiéndolas en agua 12 h para romper la dormancia física, es decir, eliminar la impermeabilidad en algún sitio de la testa y así permitir la absorción del agua y por lo tanto la germinación.

8.3. Trabajo de laboratorio

8.3.1. Procedencia de los inóculos

El inóculo de hongo micorrizógeno se obtuvo de muestras de suelo provenientes del Valle del Mezquital, Hidalgo y del cual se realizó un conteo de esporas del suelo para determinar la cantidad aproximada por cada 100 g de suelo. La bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium etli* se tomó de un inóculo comercial de la compañía Biofabrica XXI (Fig.5).



Figura 5. Empaque de biofertilizante comercial de *Rhizobium etli*, Biofabrica siglo XXI.

8.3.2. Inoculación y trasplante

La inoculación se realizó durante el trasplante, aplicando directamente el inóculo en la parte superior del sustrato colocado en las macetas ya que esto permite a los hongos mayor probabilidad de establecimiento y así expresar sus beneficios en corto tiempo (Alarcón, 2005).

Se conformaron cuatro lotes de 30 macetas, las cuales se dividieron en:

1. 30 inoculadas con HMA, 1000 g de suelo-arena sílica esterilizado y 50 g de suelo con inóculo de micorrizas con un aproximado de 40 esporas.
2. 30 macetas inoculadas con *Rhizobium etli*, 1000 g de suelo-arena sílica y 4 g de suelo con inóculo de *Rhizobium etli*.

3. 30 macetas testigo con 1000 g de suelo-arena sílica estéril.
4. 30 macetas inoculadas con HMA y *Rhizobium etli* (HMA+Re) 1000 g de suelo-arena sílica esterilizado, 50 g de suelo con inóculo de micorrizas con un aproximado de 40 esporas y 4 g de suelo con inóculo de *Rhizobium etli*.

En cada maceta se colocó una plántula una vez que presentaban cotiledones era tomadas como aptas para trasplantarse (Fig.6).

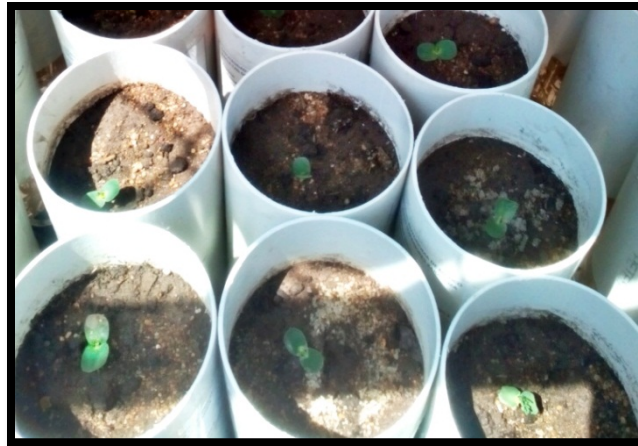


Figura 6. Plántulas de mezquite.

8.3.3. Mediciones

Se realizaron registros semanales por seis meses: la altura, el diámetro mayor y el diámetro menor, así como un conteo del número de pinnas el último mes de experimento en todos los tratamientos aplicados a las plantas de *Prosopis laevigata*.

8.3.4. Diseño estadístico

El diseño estadístico durante el experimento consistió en un ANOVA de un factor el cual fue la biofertilización con cuatro niveles para comparar parámetros como: altura, número de pinnas y cobertura; después del experimento se obtuvieron registros como: biomasa húmeda y seca de la parte aérea y radical, tasa de crecimiento, uso eficiente del agua (UEA), evapotranspiración real (ETR) con el fin de obtener una comparación entre los cuatro tratamientos. Se usó una prueba paramétrica si los datos se ajustaban a una distribución normal; si no era el caso, se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

8.3.5. Supervivencia

La supervivencia de las plantas se registró de forma semanal desde inicio del periodo de desarrollo en invernadero. Para obtener el índice de supervivencia, al término se estimó el porcentaje de plantas vivas respecto al número inicial.

8.3.6. Cobertura

Para obtener la cobertura de las plantas se hizo la medición del diámetro mayor y menor tomando como referencia el centro de la planta posteriormente se utilizó la siguiente fórmula:

$$Co = \pi r^2$$

Donde:

Co= Cobertura

r= radio de la planta, en donde $r = (\text{diámetro mayor} + \text{diámetro menor}) / 4$

8.3.7. Tasa de crecimiento relativo (TCR)

La tasa de crecimiento relativo es un indicador importante de la estrategia de la planta con respecto a la productividad y los regímenes de disturbio del ambiente. La TCR es el incremento (exponencial) en tamaño en relación al tamaño de la planta tal como era al principio de un intervalo de tiempo dado. La tasa relativa de crecimiento de las plantas, se calculó a partir de la altura máxima de las plantas al inicio y al final del periodo de cultivo en condiciones de invernadero. Se utilizó un modelo de crecimiento exponencial, el cual describe adecuadamente la fase inicial de desarrollo vegetal (Charles Edwards *et al.*, 1986). La fórmula empleada es la siguiente:

$$TCR = [\ln(\text{altura final}) - \ln(\text{altura inicial})] / t (\text{días})$$

Por lo cual las unidades de tasa de crecimiento son: $((\text{mm} / \text{mm}) / \text{d})$ o $[\text{d}^{-1}]$

Se hizo un promedio de alturas finales y de alturas iniciales para enseguida aplicarle logaritmo natural (\ln) y dividirlo entre el número de días que duró el experimento; este método corresponde al modelo de crecimiento exponencial, el cual describe adecuadamente la primera fase del desarrollo vegetal (Charles-Edwards *et al.*, 1986). Las mediciones se llevaron a cabo con un vernier hasta los 20 cm y después con una regla tomando semanalmente la altura de las plantas.

8.3.8. Biomasa húmeda, seca y cociente raíz/vástago (R/V)

La biomasa húmeda total de las plantas y el cociente: (biomasa radical) / (biomasa aérea) o raíz/vástago o proporción R/V, se calculó después de cosechar las plantas al final del periodo de crecimiento en el invernadero. Para esto, las plantas se extrajeron cortando a ras de suelo la parte del vástago para después cuidadosamente comenzar a extraer las raíces de las macetas, después se lavaron con agua de la llave y se realizó un corte de raicillas a 10 ejemplares fijándolas en alcohol al 50% para realizar posteriormente un análisis de colonización micorrízica, después se registró el peso húmedo pesando ambas partes en una balanza analítica.

Para el peso seco se colocaron los vástagos y raíces en bolsas de papel para introducirlos en una estufa a 75 °C por 48 horas una vez que se sacaron de la estufa, se tomó su peso en gramos en una balanza analítica (Fig.7) para obtener la biomasa seca realizando una regla de tres, utilizando el peso de la biomasa húmeda total, el peso húmedo de la raíz sin la sección de raicillas utilizadas para la determinación de la colonización micorrízica y el peso seco de la misma.

Finalmente, se calculó el cociente R/V para los cuatro tratamientos, este cociente se determinó con la biomasa seca el cual indica la cantidad de biomasa invertida en la raíz con relación al vástago (González-Monterrubio *et al.*, 2005).



Figura 7. Peso húmedo de vástago y raíz de *Prosopis laevigata*.

8.3.9. Evapotranspiración real (ETR)

La transpiración vegetal consiste en la pérdida de agua en forma de vapor que se produce en las plantas. A las hojas de éstas llega gran cantidad de agua absorbida por las raíces, pero sólo una pequeña parte se utiliza en la fotosíntesis. Su principal función es eliminar en forma de vapor el agua que no es utilizada por las plantas. Además, el agua transpirada permite el enfriamiento de la planta, debido al elevado calor de vaporización del agua. La evotranspiración real es la cantidad agua perdida por evaporación del suelo más la transpiración de la planta (Luna, 2005).

La evatranspiración real se calculó pesando las macetas regando a capacidad de campo las macetas y volviéndolas a pesar una semana después antes de regarlas para obtener la transpiración de las plantas y con un grupo de macetas que sólo contenían suelo se repitió el procedimiento de regar a capacidad de campo para volverlas a pesar una semana después y así obtener la evaporación y de este modo obtener la evapotranspiración real con la siguiente fórmula:

$$ETR = EV - Tr$$

Donde:

ETR=Evapotranspiración real

EV= Evaporación

Tr= transpiración

8.3.10 Eficiencia del uso del agua (EUA)

La pérdida de agua puede ser dañina para el crecimiento de las plantas, por lo que muchas plantas han desarrollado mecanismos de fijación de CO₂, que permita un uso eficiente del agua. Un parámetro usado para mostrar el total de CO₂ fijado (beneficio) por unidad de agua perdida (costo), es el uso eficiente de agua, el cual se define como la proporción entre la materia seca producida y el consumo de agua en un periodo determinado (Salisbury y Ross, 1994).

Se determinó la eficiencia en el uso del agua a partir la fórmula siguiente:

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

8.3.11. Porcentaje de colonización micorrízica

Para calcular el porcentaje de colonización micorrízica las raicillas recolectadas de cada tratamiento se colocaron en KOH al 10% durante 1 día, lo que es conocido como la etapa de clareo, posteriormente las raicillas se enjuagaron con agua destilada y se les agregó peróxido de hidrógeno durante 2 horas, a esta etapa se le conoce como blanqueado, y finalmente para la fase de acidificación se enjuagaron las raicillas y se les colocó ácido clorhídrico al 10% durante 5 minutos, se retiró el ácido clorhídrico de las muestras y sin enjuagar se les agregó azul de tripano para la etapa de tinción.

El montaje de las muestras se realizó cortando trozos de 1 a 2 cm de raicillas intentando manipularlas lo menos posible para no dañarlas y se colocaron de forma paralela en un portaobjetos (Fig.8), se colocan cubre objetos y se observaron al microscopio (Phillips y Hayman, 1970). Se realizaron 40 observaciones por cada muestra.

El porcentaje de colonización de raíces se calculó con la siguiente fórmula propuesta por Sieverding (1983).

$$\text{Porcentaje de colonización} = \frac{\text{Segmentos colonizados}}{\text{Total de segmentos}} \times 100$$

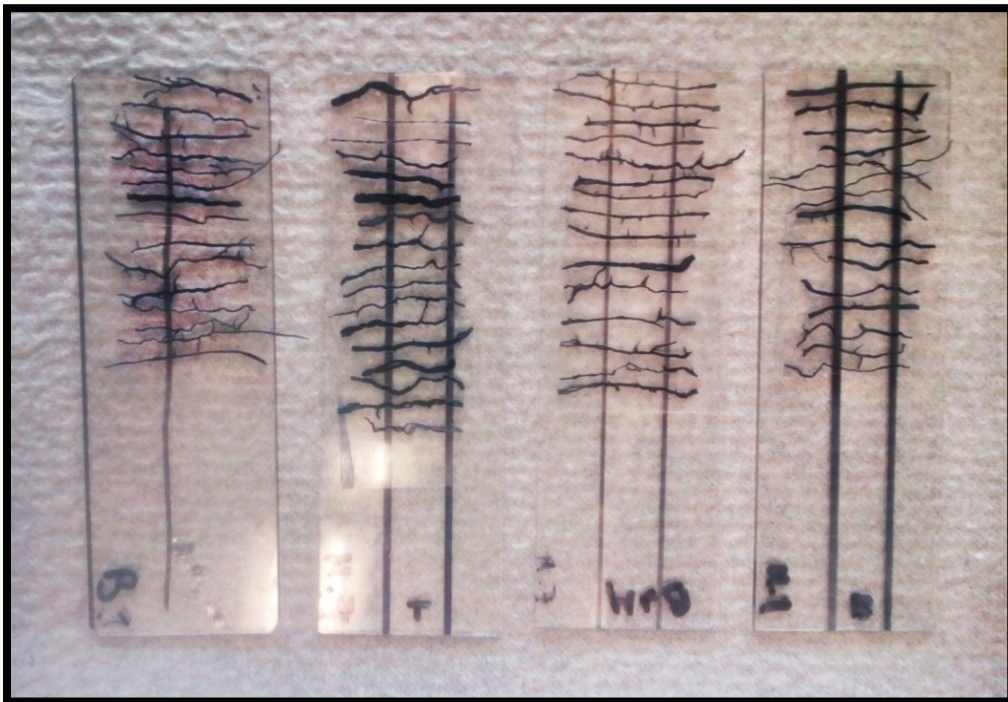


Figura 8. Montaje de raicillas para observar en microscopio y determinar el porcentaje de colonización micorrízica.

8.3.12. Extracción de esporas

Este procedimiento se llevó a cabo para cuantificar el número de esporas presentes en suelo y con ello estimar el potencial efectivo de los HMA. Se utilizó la técnica de tamizado húmedo y decantación (modificada de Gedermann y Nicolson, 1963) y una centrifugación de sacarosa (modificada de Daniels y Skipper, 1982).

Para la extracción de esporas se pesaron 100 g de suelo seco y tamizado, se colocaron en un vaso de metal y se le agregó agua corriente para precipitarlo con un motor eléctrico para la dispersión de agregados del suelo (marca LAMEX, Fig.9) por 10 minutos con el fin de soltar las esporas, se dejó reposar de 15-20 segundos y se filtró el sobrenadante a través de tamices de distintas aperturas de malla, de 2000 μm y 44 μm y se volvió a agregar agua y resuspender dos veces más la muestra por 30 segundos, enseguida se filtró el sobrenadante en los mismos tamices y lo que quedó en el tamiz de 44 μm se colocó en tubos para centrifuga con agua y se centrifugo a 2000 rpm por 5 minutos, una vez que finalizó de centrifugar se decantaron los tubos de centrifuga recuperando únicamente el botón y se resuspendió en una solución de sacarosa al 50% (Fig.10) para centrifugarse a 1000 rpm por 3 minutos, finalmente solo se recuperó el sobrenadante, se filtró en un tamiz de 44 μm cuidando de enjuagar bien para retirar restos de sacarosa, se colocó en cajas Petri, se observó y contabilizó el contenido de esporas con un estereoscopio.



Figura 9. Motor eléctrico para la dispersión de agregados.

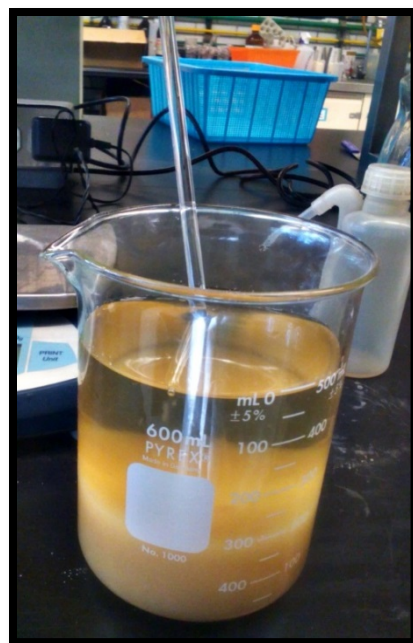


Figura 10. Solución de sacarosa al 50%.

8.3.13 Determinación de *Rhizobium etli*

La determinación de la presencia de *Rhizobium etli* se hizo de la siguiente manera:

Se cortaron raicillas de diferentes zonas de la raíz de la planta y se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de sustrato, se colocaron en cloro al 10% durante 9 minutos para su desinfección externa, después se enjuagaron con agua destilada en una campana y las raíces se maceraron en condiciones de esterilidad, para posteriormente realizar una tinción Gram con la metodología siguiente:

- 1- Se colocaron dos gotas de raíz macerada en un portaobjetos, dejando secar al aire, una vez seco se fijó al calor de la llama de un mechero Bunsen.
- 2- Se cubrió con cristal violeta durante un minuto para su tinción diferencial, pasado este tiempo se lavó con agua destilada y se escurrió.
- 3- Se aplicó durante un minuto yodo Gram durante un minuto y después de enjuago con agua destilada y se escurrió.
- 4- Se decoloro con alcohol Gram por espacio de 15 o 20 s, se enjuagó con agua destilada y se dejó escurrir.
- 5- Como último paso de la tinción, se contrastó con safranina durante un minuto, se enjuago con agua destilada y se dejó escurrir.
- 6- Se observó en microscopio a 100x con aceite de inmersión (Fig.11).

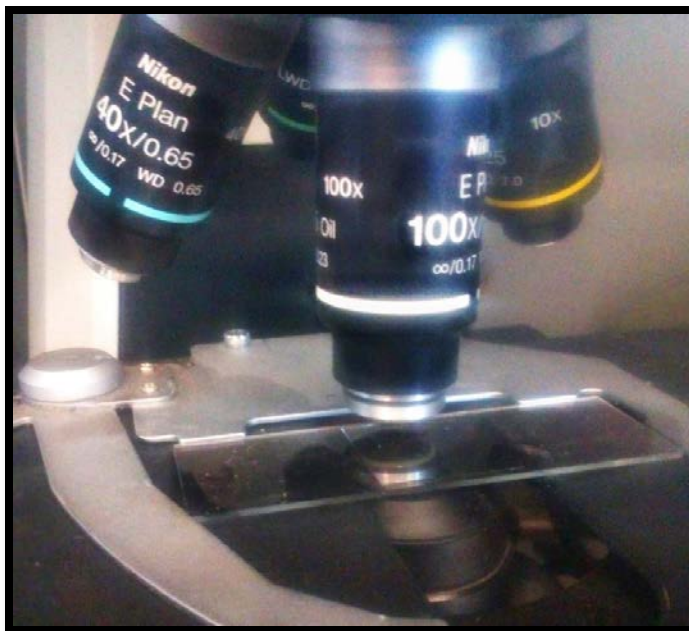


Figura 11. Observación de la tinción Gram a 100x.

9. Resultados y discusión

9.1. Germinación de semillas

Se obtuvo el 100% de germinación después de aplicar la escarificación mecánica, lo cual coincide con lo reportado por Cervantes 2013 (Fig.12, 13, 14).

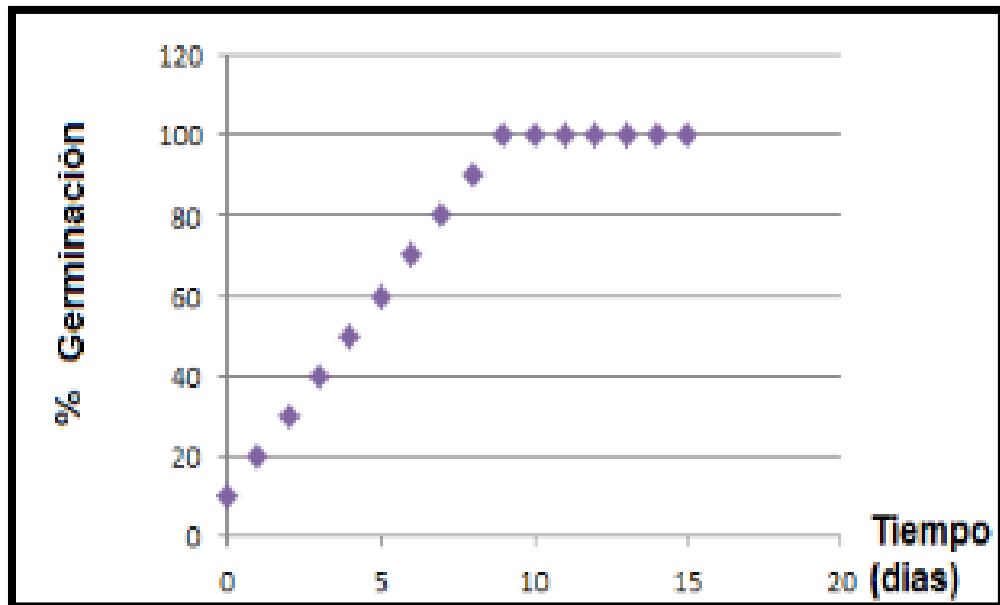


Figura 12. Gráfica de porcentaje de germinación. Tomada de Cervantes, 2013.



Figura 13. Emergencia de radículas.



Figura 14. Emergencia de cotiledones.

9.2. Supervivencia

Como se puede observar en la Figura 15, al aplicar una prueba de Kruskal-Wallis solo se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos de HMA y HMA+Re comparados con el testigo. En cuanto a los porcentajes, el tratamiento de HMA fue el que mayor porcentaje de supervivencia tuvo con un 90%, seguido del tratamiento de inoculación doble (HMA+Re) con 86.6% de supervivencia, le siguió el tratamiento de *Rhizobium etli* con 83.3% de supervivencia y por último el tratamiento testigo obtuvo un 43.3%, lo cual muestra que la micorrización favorece la supervivencia en este caso obteniendo hasta un 90% y 86.6% respectivamente, esto se debió probablemente a que la presencia de hongos micorrizógenos arbusculares, favorece a la absorción de agua, nutrimentos minerales, protegen a la raíz contra patógenos, además de ayudar a resistir el estrés que se produce durante condiciones de sequía, salinidad en el suelo, lo que coincide con lo mencionado por Cervantes (2013), quien reporta que para *Prosopis laevigata* obtuvo 70% de supervivencia en comparación con los testigos los cuales obtuvieron solo el 20%.

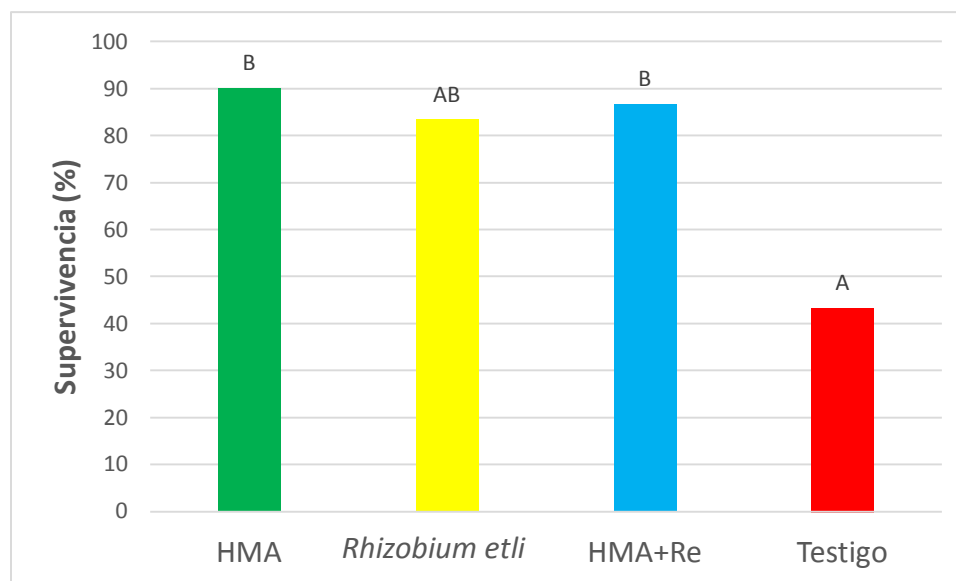


Figura 15. Porcentaje de supervivencia final en plantas de *Prosopis laevigata*. Las letras distintas representan las diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

9.3. Altura máxima

A partir de los datos registrados a través de los seis meses de observación, bajo los cuatro tratamientos (HMA, *Rhizobium etli*, HMA+Re y Testigo), los promedios finales obtenidos fueron de 15.4 cm para *Rhizobium etli*, 12.9 cm para el tratamiento con HMA, 12.3 cm en HMA+Re y en el grupo testigo la altura promedio fue de 11.1 cm (Fig.17). Se utilizó una prueba Kruskal-Wallis para

datos no paramétricos en donde se obtuvieron diferencia significativas entre el tratamiento de HMA comparado con el grupo testigo; asimismo, el tratamiento de *Rhizobium etli* se diferenció significativamente del tratamiento de HMA+Re y del grupo testigo; el tratamiento de HMA+Re únicamente mostró diferencias significativas con el tratamiento de *Rhizobium etli* siendo el tratamiento con mayor promedio de altura el inoculado con *Rhizobium etli* (Fig.16), probablemente fue debido a que esta simbiosis le provee de una mayor cantidad de nitrógeno disponible a la planta, y al ser el nitrógeno un nutriente esencial en las plantas, el cual estimula el crecimiento vegetal tanto en cultivos de invernadero como en campo abierto se potencializo el desarrollo de la altura de las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2001).

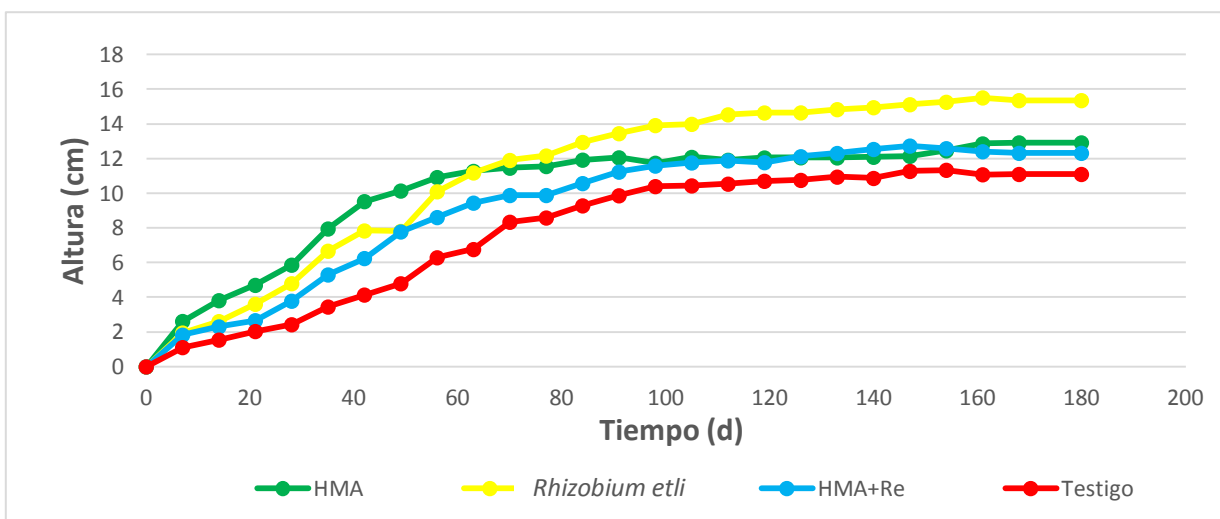


Figura 16. Comparación de la altura de los tratamientos a través del tiempo.

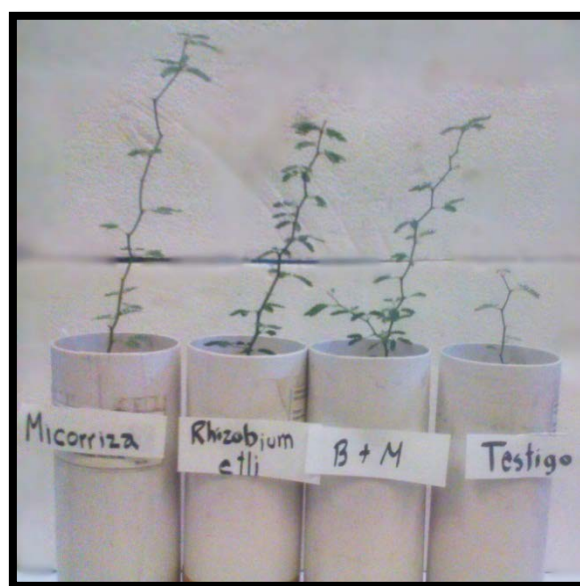


Figura 17. Comparación de la altura final entre tratamientos.

9.4. Cobertura

No se obtuvieron diferencias estadística significativa entre los tratamientos HMA, HMA+Re y *Rhizobium etli*, pero si una diferencia significativa comparados con el grupo testigo (Fig.19) lo cual pudo ser debido a una plaga de un hongo y araña roja que hizo perder hojas a las plantas, la cual fue tratada con una preparacion de cola de caballo. El tratamiento de HMA obtuvo un promedio de 18.3 cm² (Fig.18), *Rhizobium etli* obtuvo un promedio de 17.5 cm², HMA+Re 16.1 cm² en promedio y el grupo testigo tuvo un promedio de 9.6 cm² de cobertura, lo cual concuerda con Torres (2005), que inoculó plantas de *Prosopis laevigata* con HMA y obtuvo resultados positivos, ya que favorecieron un mayor desarrollo vegetal en cuanto a altura, cobertura, número de pinnas, en comparación con los tratamientos sin inocular.

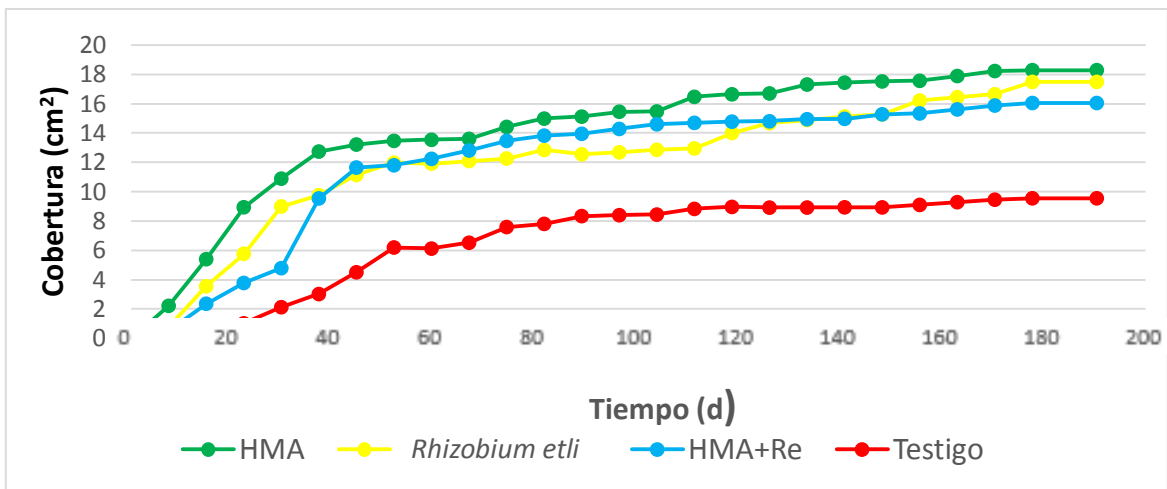


Figura 18. Comparación de la cobertura semanal en cada tratamiento obtenida a través de 180 días de observación.

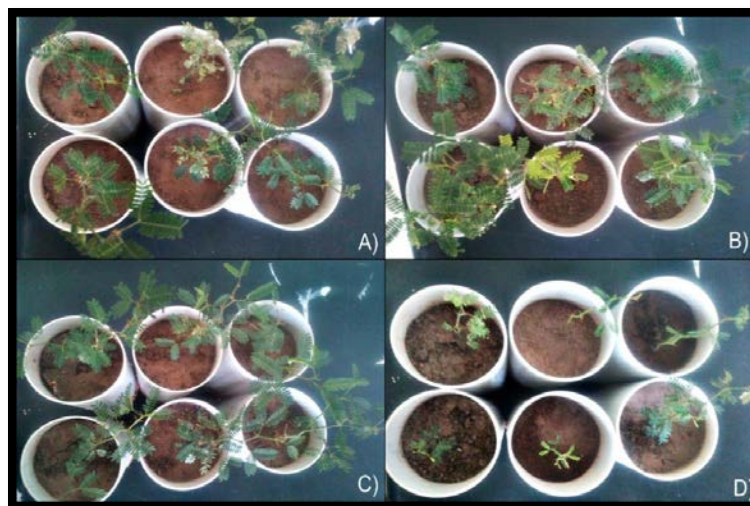


Figura 19. Cobertura final por tratamiento, A) HMA B) *Rhizobium etli* C) HMA+Re D) Testigo.

9.5. Número de pinnas

En cuanto a la comparación en el número final de pinnas (Fig.20), se obtuvo una diferencia significativa entre el tratamiento HMA y los tratamientos de *Rhizobium etli* y HMA+Re, así mismo se obtuvo una diferencia significativa entre los tres tratamientos de inoculación (HMA, *Rhizobium etli* y HMA+Re) comparados con el grupo testigo lo que coincide con el trabajo de Vázquez (2014) con *Yucca filifera* y Flores (2016) con *Dracocephalum moldavica* en donde reportan una mayor altura y número de hojas en los tratamientos micorrizados en comparación con los grupos testigos.

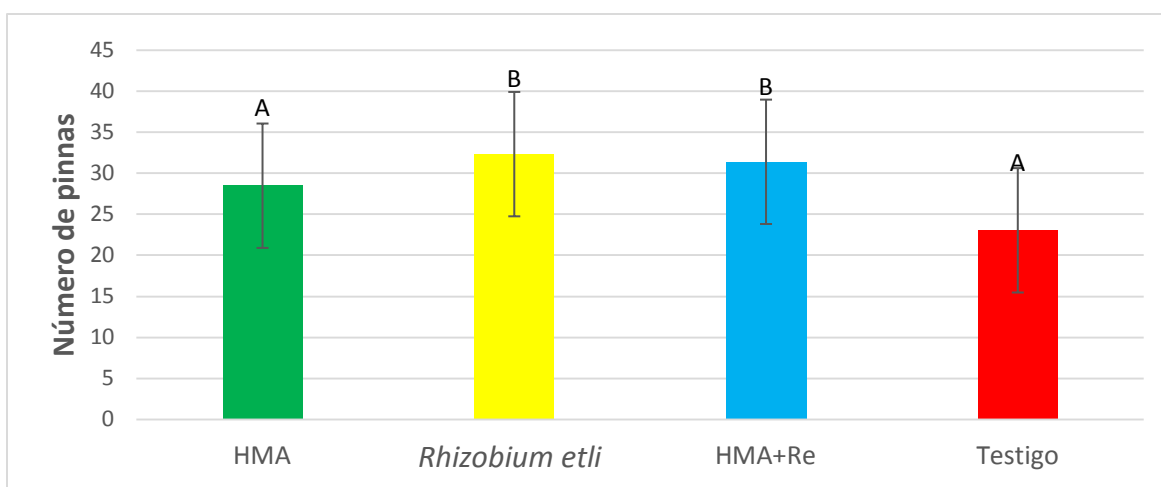


Figura 20. Comparación por tratamiento de número de pinnas el día 168. Las letras distintas representan las diferencias significativas entre tratamientos y las líneas el error estándar.

9.6. TCR

La tasa de crecimiento relativo mostró diferencias significativas entre tratamientos, donde el tratamiento de *Rhizobium etli* fue el que obtuvo un mayor valor con un 0.0122 d^{-1} , seguido del tratamiento de HMA+Re que obtuvo un 0.0114 d^{-1} , el tratamiento de HMA obtuvo 0.0095 d^{-1} , y el grupo testigo obtuvo un 0.0080 d^{-1} , por lo que todos los tratamientos de inoculación tuvieron una tasa de crecimiento mayor respecto al grupo testigo (Fig.21). La TCR pudo ser mayor en el tratamiento de *Rhizobium etli*, ya que al tener una mayor disponibilidad de nitrógeno y al ser este un estimulante del crecimiento, pudo haber favorecido el desarrollo de ese tratamiento, en cuanto a los tratamientos inoculados con micorriza, concuerdan con el trabajo de Flores (2016) con *Dracocephalum moldavica* en donde reportan una TCR mayor en los tratamientos micorrizados en comparación con grupos testigos.

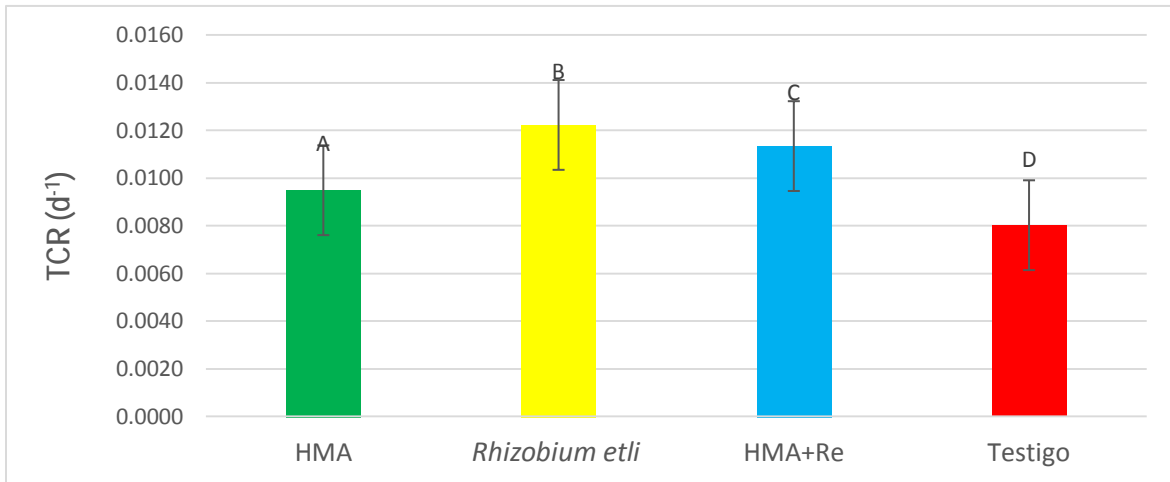


Figura 21. TCR de los tratamientos aplicados a *P. laevigata*. Las letras distintas representan las diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) y las líneas representan un error estándar por encima de la media.

9.7. Eficiencia del uso del agua

La disponibilidad de agua depende de la cantidad de agua que esté presente en el suelo (agua capilar), la cual es absorbida por las raíces, aunque parte de ésta puede perderse por evaporación directa de la atmósfera. Si no hay nuevos aportes de agua, el suelo se irá secando con el transcurso de los días, originando un estrés hídrico en la planta (Torres, 2005). Se obtuvo una diferencia significativa entre los tratamientos aplicados a *Prosopis laevigata*, sin embargo el tratamiento que obtuvo el uso más eficiente del agua fue HMA+Re (Fig.22) en el cual se obtuvo 0.030 g/L, comparado con lo obtenido en los demás tratamientos donde *Rhizobium etli* obtuvo 0.035 g/L, HMA 0.030 g/L y el grupo testigo 0.018 g/L, asimismo se ha reportado que esta especie tiene una alta resistencia al calor extremo, sequía y alcalinidad, pastoreo y ramoneo (Fagg y Stewart, 1994).

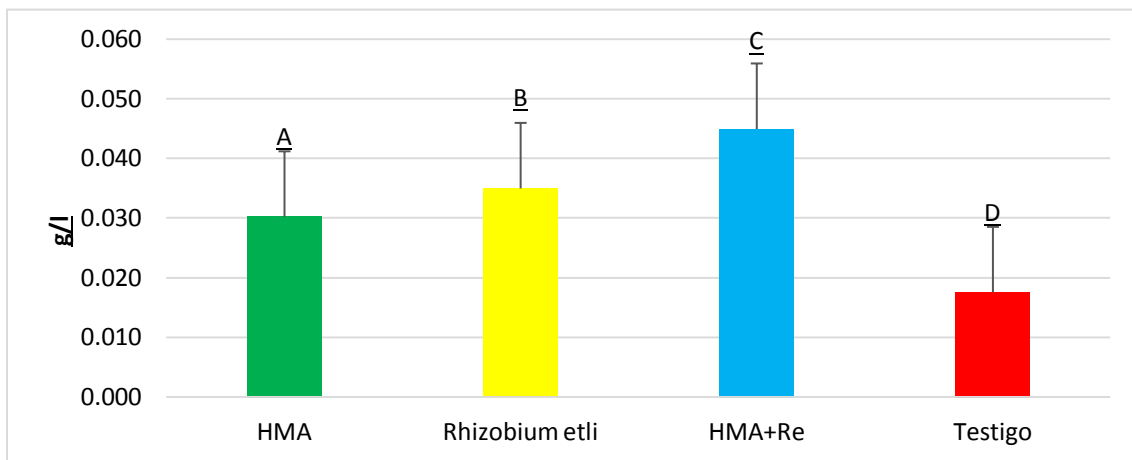


Figura 22. Eficiencia del uso del agua en *Prosopis laevigata*. Las letras distintas representan las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos y las líneas representan un error estándar por encima de la media.

9.8. Biomasa húmeda del vástago y la raíz

Se obtuvo una diferencia significativa entre el tratamiento de HMA+Re comparado con el grupo testigo y los tratamientos de HMA y *Rhizobium etli*, así como una diferencia significativa entre los tres tratamientos de inoculación (HMA, HMA+Re y *Rhizobium etli*) comparados con el grupo testigo (Fig.23). Ferrera-Cerrato (1993), menciona que en estudios realizados con leguminosas micorrizadas, éstas presentan mayor crecimiento y mayores concentraciones de minerales como N, P, Ca, Cu y Mn, en comparación a las plantas no micorrizadas por lo tanto al presentar estas ventajas las plantas micorrizadas adquieren una mayor biomasa húmeda.

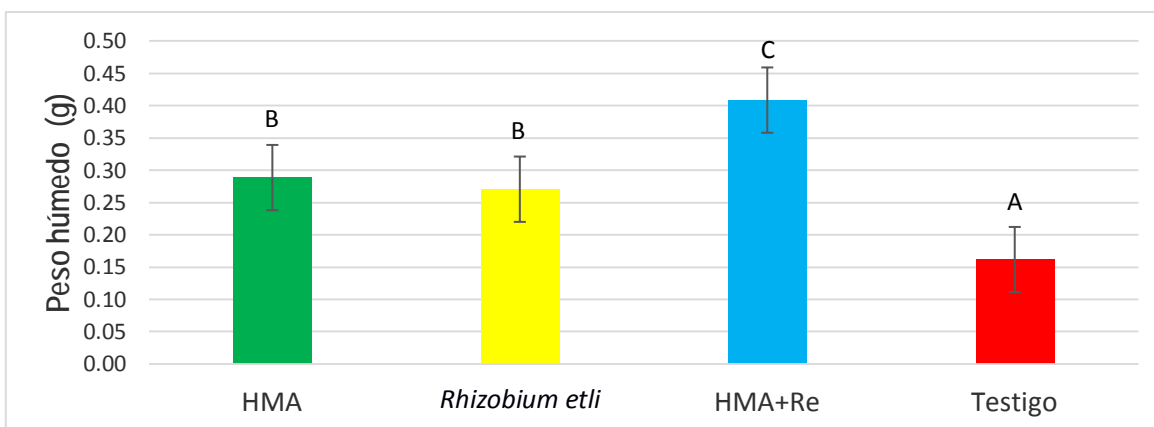


Figura 23. Peso húmedo de la raíz de los tratamientos aplicados a *P. laevigata*. Las letras distintas representa diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) y las líneas un error estándar arriba de la media.

Se obtuvo una diferencia significativa entre el tratamiento de HMA+Re en comparación con los tratamientos de HMA, *Rhizobium etli* y el grupo testigo, así como una diferencia significativa entre los tres tratamientos de inoculación comparados con el grupo testigo, los tratamientos que no presentaron diferencias significativas entre ellos fueron el tratamiento de HMA y el de *Rhizobium etli* (Fig.24).

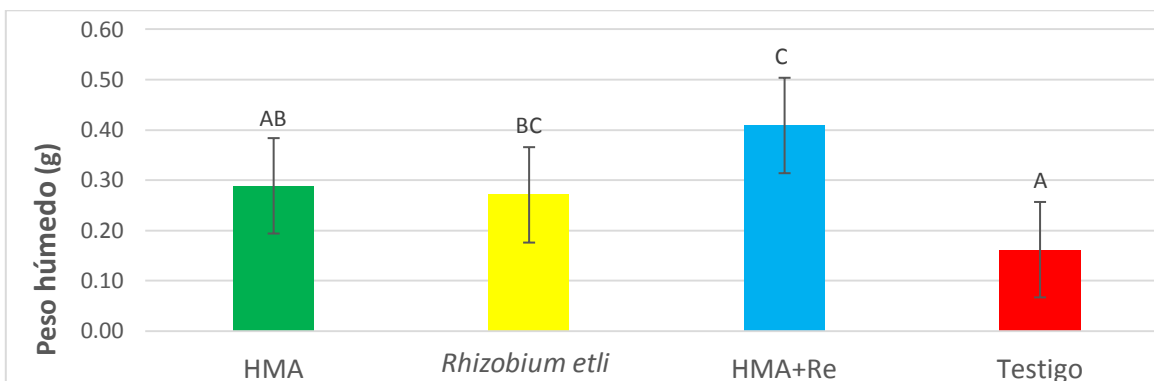


Figura 24. Peso húmedo de raíz de los tratamientos aplicados a *P. laevigata*. Las letras distintas representan las diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) y las líneas un error estándar arriba de la media.

9.9. Evapotranspiración real (ETR)

Al evaluar la evapotranspiración real no se obtuvo una diferencia significativa entre los tratamientos de inoculación (HMA, HMA+Re, *Rhizobium etli*) sin embargo, si se obtuvo una diferencia significativa en comparación con el grupo testigo, en cuanto al promedio de evapotranspiración real. Los dos tratamientos con mayor evapotranspiración son el tratamiento con HMA y el de HMA+Re los cuales obtuvieron 287.30 mm y 283.32 mm respectivamente, seguidos de *Rhizobium etli* con 280.91 mm y finalmente el grupo testigo con 202.25 mm (Fig.25). En los dos tratamientos en donde se obtuvo mayor evapotranspiración se encuentra como característica, la inoculación con HMA; esto puede ser resultado de la simbiosis con los hongos micorrizógenos arbusculares, ya que mediante ésta, la planta obtiene una mayor cantidad de agua extraída del suelo a través de hifas extra radicales, que actúan como una extensión natural del sistema radical de la planta (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000) y por lo tanto el agua no requerida es desechada.

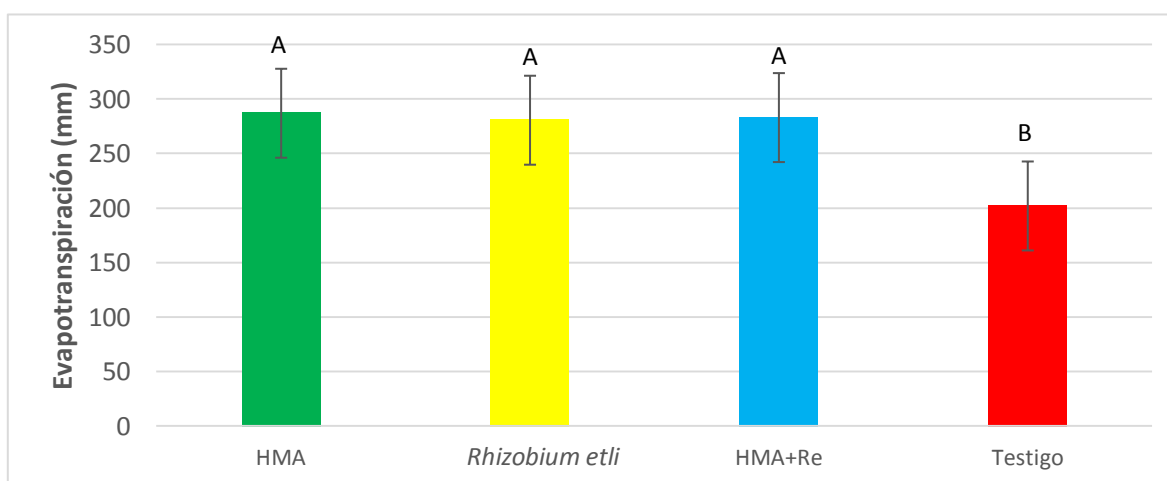


Figura 25. Evapotranspiración real de los tratamientos aplicados a *P. laevigata*. Las letras distintas representan las diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) y las líneas un error estándar arriba de la media.

9.10. Cociente raíz/vástago (R/V)

El cociente R/V indica la cantidad de materia orgánica producida para formar raíz y vástago. Se observó que existe una diferencia significativa en las plantas inoculadas con HMA+Re comparadas con el grupo testigo, sin embargo, el tratamiento de *Rhizobium etli* obtuvieron un cociente R/V mayor en comparación con los demás tratamientos y el grupo testigo, seguida del tratamiento HMA+Re, y por último el tratamiento de HMA y el testigo (Fig.26). El resultado obtenido puede ser debido a que las plantas inoculadas con *Rhizobium etli* al tener más disponibilidad de nitrógeno el cual sirve para la producción de biomasa, favoreció el desarrollo de la biomasa en vástago y raíz y en los tratamientos

con HMA presentaron mayor producción radical, debido a que las raíces son las encargadas de buscar los nutrientes presentes en el suelo, cuando las plantas se micorrizan la superficie de absorción es mayor, la biomasa radical aumenta dando como resultado un incremento en el cociente R/V.

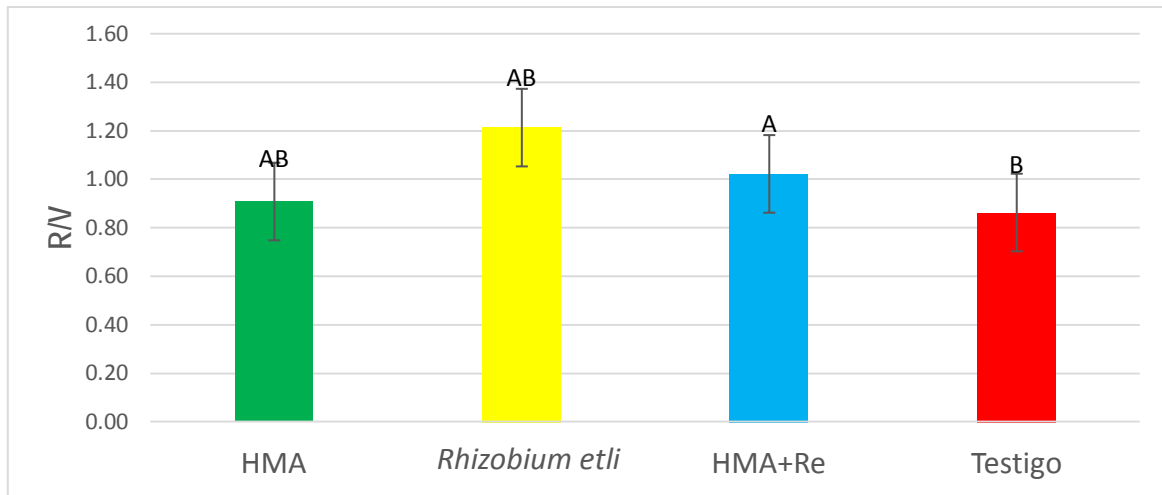


Figura 26. Cociente Raíz/Vástago de los tratamientos aplicados. Las letras distintas representan las diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) y las líneas un error estándar arriba de la media.

9.11. Porcentaje de colonización micorrízica

Se obtuvo una diferencia significativa entre los tratamientos de HMA y HMA+Re comparados con el tratamiento de *Rhizobium etli* y el grupo testigo y de acuerdo a las observaciones hechas en microscopio (Fig.28) el porcentaje de colonización micorrízica no presentó un porcentaje significativo como contaminación en los tratamientos de *Rhizobium etli* y el testigo, con un 2% y 1.3% respectivamente, mientras que en los tratamientos donde se buscaba obtener un porcentaje alto de colonización se obtuvo un porcentaje ligeramente mayor en el tratamiento de HMA+Re con un 78% sobre el tratamiento de HMA que obtuvo un 76% (Fig.27). Este resultado ligeramente mayor podría deberse a que las hifas externas de las micorrizas arbusculares pueden ser capaces de utilizar el NO_3 y NH_4^+ ; las informaciones que se tienen acerca del papel de las vesículas y arbusculos en la asimilación del nitrógeno y como la colonización es influenciada por la disponibilidad individual y combinada de estos dos parámetros en el suelo no es comprendida aún. De acuerdo a investigaciones realizadas, la aplicación de nitrógeno en el suelo puede tener cierto efecto inhibitorio o estimulante para la colonización de micorrizas arbusculares. Diversas formas de nitrógeno inorgánico en el suelo pueden influir en el porcentaje de colonización, la longitud de las raíces y la presencia de estructuras colonizantes como los arbusculos y vesículas (Valentine *et al.*, 2002).

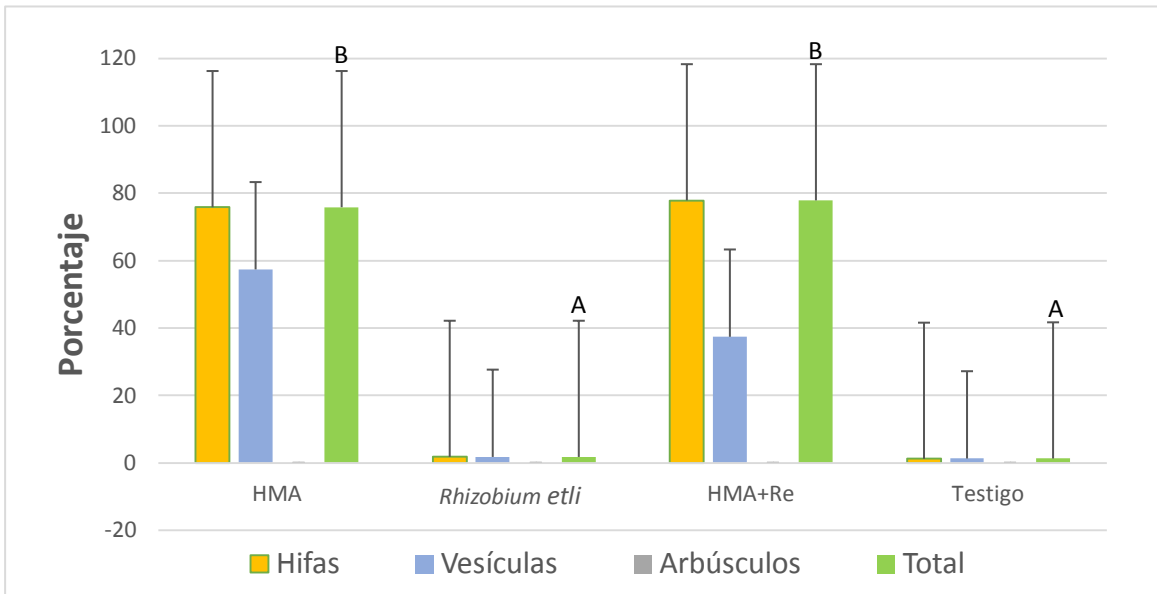


Figura 27. Porcentaje de colonización micorrizica radical. Las letras distintas representan las diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) y las líneas un error estándar arriba de la media.

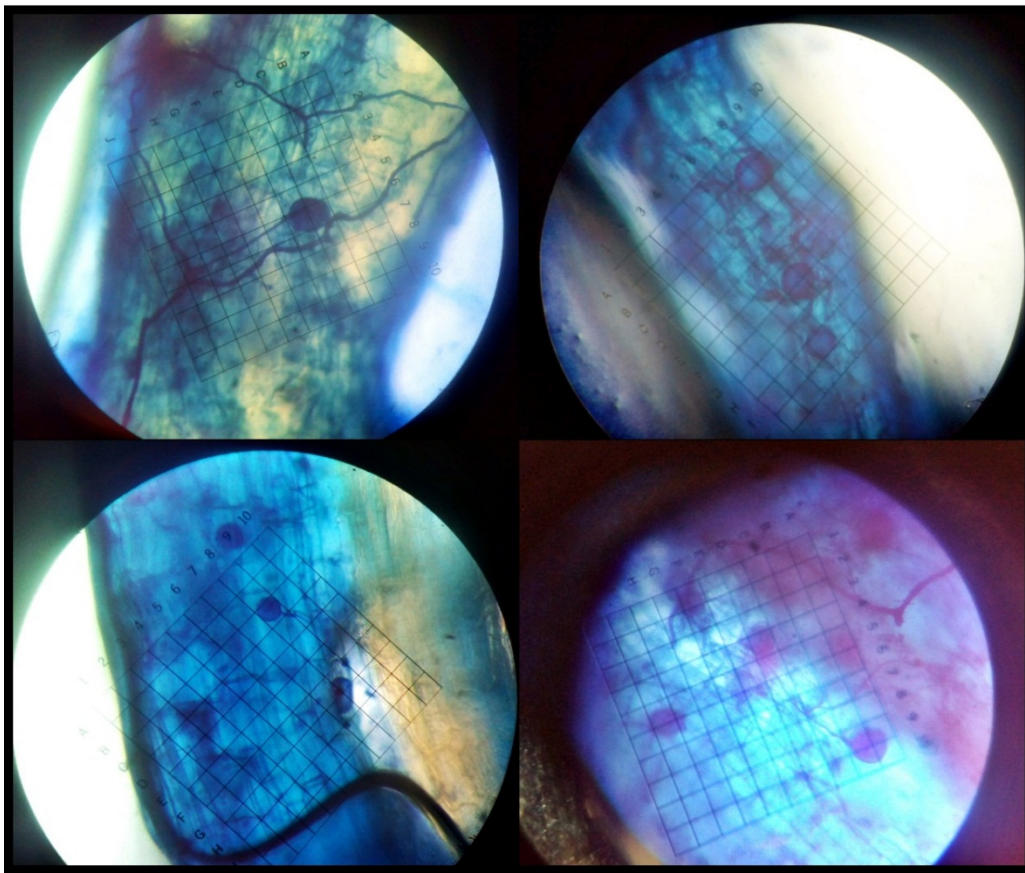


Figura 28. Vesículas e hifas. Fotografía tomada a 40X.

9.12. Conteo de esporas

Se obtuvo una diferencia significativa a favor de los tratamientos de HMA y HMA+Re en comparación con el tratamiento de *Rhizobium etli* y el grupo testigo. En cuando al promedio de esporas encontradas en el suelo, este fue mayor en el tratamiento de HMA (Fig.29) con un promedio de 40.2%, seguido del tratamiendo de HMA+Re con un promedio de 23%, finalmente en los tratamientos de *Rhizobium etli* y testigo, donde se esperaba no encontrar colonizacion de este tipo, se obtuvieron 2.4 y 1.6% respectivamente por lo cual se tuvo un porcentaje de contaminación entre tratamientos mínima.

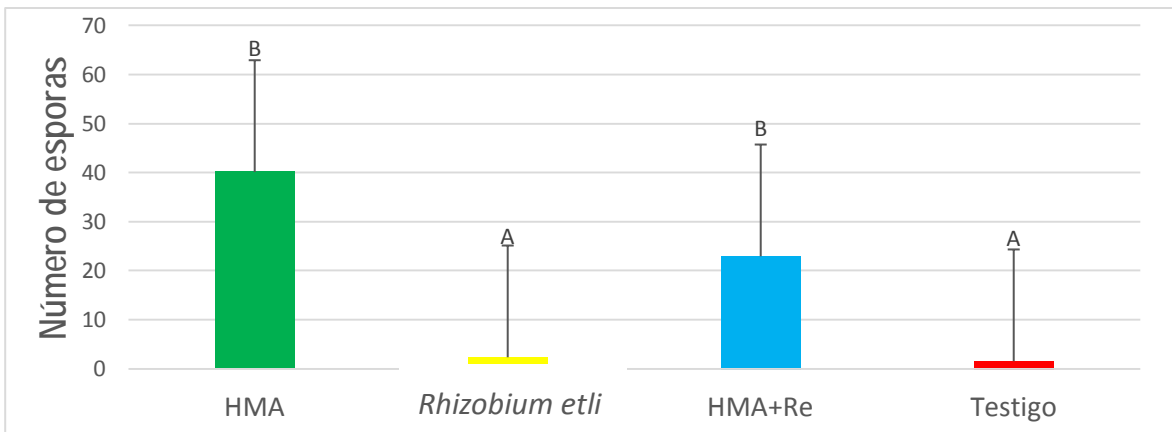


Figura 29. Conteo de número de esporas por cada 100 g de sustrato. Las letras distintas representan las diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) y las líneas un error estándar arriba de la media.

9.13. Determinación de la presencia de *Rhizobium etli*

La presencia de *Rhizobium etli* en las raíces de los tratamientos inoculados con esta bacteria, se realizó mediante una tinción Gram, en la cual se observó una coloración rosa (Fig.31 y 32) y al ser *Rhizobium etli* una bacteria Gram negativa, se confirmó su presencia dentro de las raíces de las plantas de los tratamientos inoculados con *R. etli* comparado con el testigo donde no se observó coloración (Fig.30).

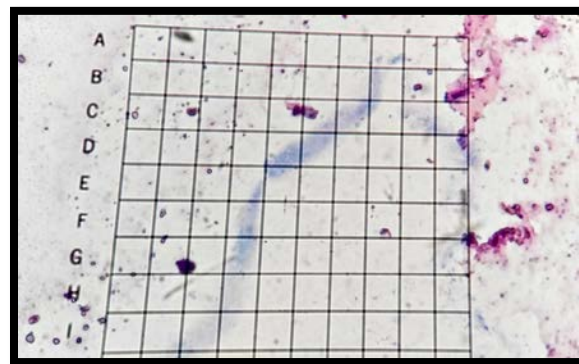


Figura.30 Tinción Gram de las raíces del grupo testigo. Fotografía tomada a 100x.

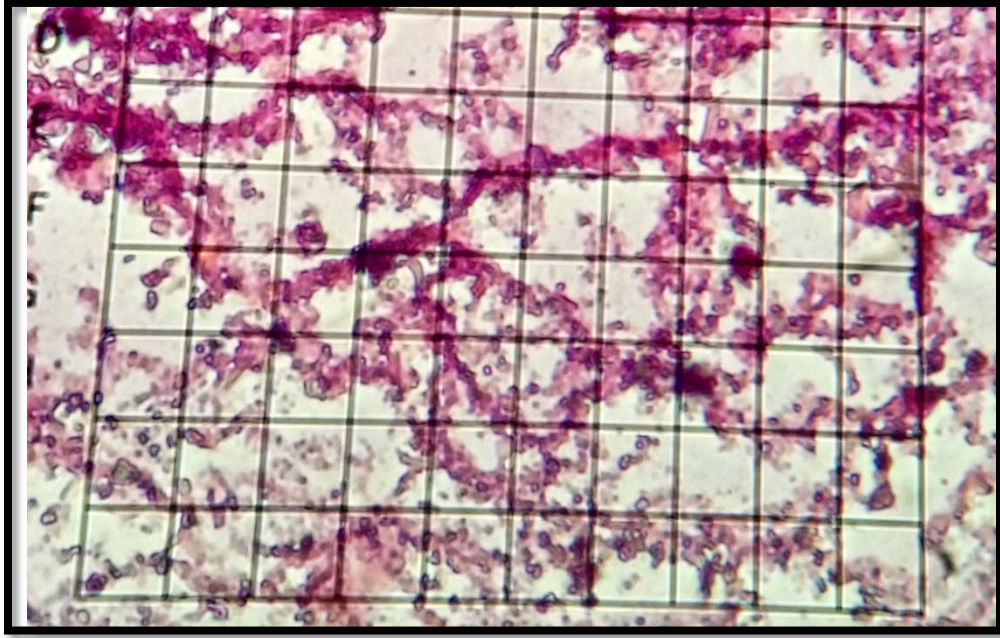


Figura 31. Tinción Gram de las raíces del tratamiento inoculado con *Rhizobium etli*. Fotografía tomada a 100x.

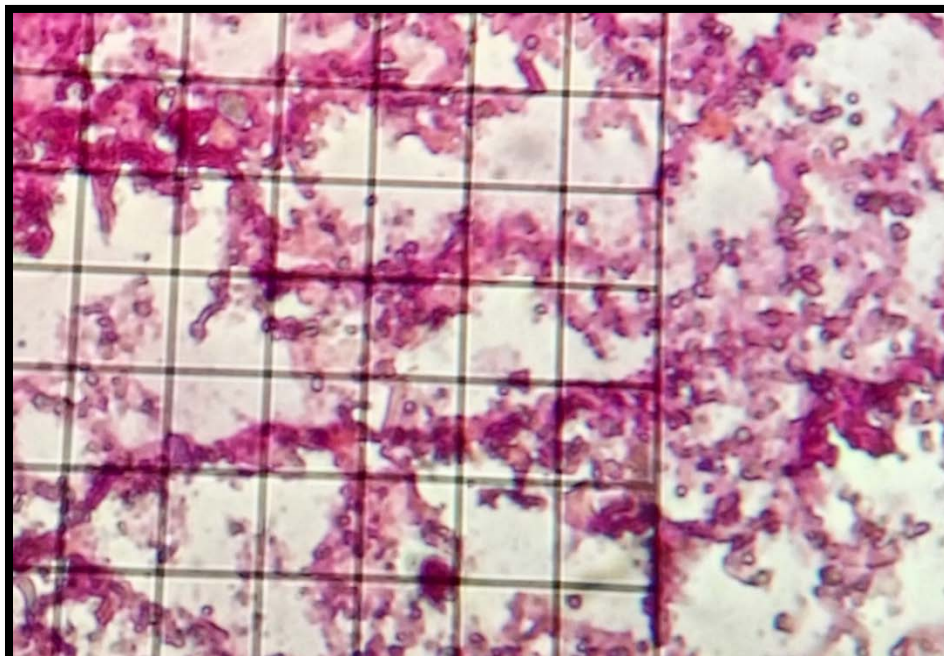


Figura 32. Tinción Gram de las raíces del tratamiento HMA+Re. Fotografía tomada a 100x.

Tabla 2. Tabla de síntesis de resultados.

Tratamiento Variable	HMA	<i>Rhizobium etli</i>	HMA+Re	Testigo	Prueba estadística	Observaciones
Supervivencia (%)	90 B	83.3 AB	86.6 B	43.3 A	Kruskall Wallis	El tratamiento de HMA fue el que obtuvo mayor porcentaje de establecimiento y supervivencia.
Altura máxima (cm)	12.9	15.3	12.3	11.7	Kruskall Wallis	<i>Rhizobium etli</i> tuvo el mayor promedio de altura.
Cobertura (cm ²)	18.3	17.5	16.1	8.6	Kruskall Wallis	El tratamiento de HMA obtuvo mayor cobertura.
Número de pinnas	28 A	32 B	31 B	23 A	ANOVA	<i>Rhizobium etli</i> obtuvo el mayor número de pinnas aunque solo obtuvo una pinna mas que HMA+Re .
TCR (d ⁻¹)	0.0095 A	0.0122 B	0.0113 C	0.0080 D	ANOVA	<i>Rhizobium etli</i> fue el tratamiento con mejores resultados en crecimiento.
Eficiencia del uso del agua (g/l)	0.030 A	0.035 B	0.045 C	0.018 D	ANOVA	HMA+Re fue el tratamiento que presento mayor eficiencia en el uso del agua.
Biomasa húmeda del vástago (g)	0.29 AB	0.27 BC	0.42 C	0.19 A	ANOVA	HMA+Re obtuvo mayor biomasa húmeda de vástago.
Biomasa húmeda de la raíz (g)	0.29 B	0.27 B	0.41 C	0.16 A	ANOVA	HMA+Re obtuvo mayor biomasa húmeda de raíz.
Evapotranspiración real (mm)	287.30 A	280.91 A	283.32 A	202.25 B	Kruskall Wallis	El tratamiento de HMA obtuvo una evapotranspiracion mayor.
Cociente R/V	0.91 AB	1.21 AB	1.02 A	0.86 B	ANOVA	Los valores mas altos los obtuvo el tratamiento de <i>Rhizobium etli</i> .
Porcentaje de colonización (%)	76 B	2 A	78 B	1.3 A	Kruskall Wallis	El tratamiento con mayor colonización micorrízica fue HMA+Re.
Número de esporas por cada 100 g de sustrato.	40.2 B	2.4 A	23 B	16 A	Kruskall Wallis	El tratamiento de HMA fue el que presento mayor número de esporas.

Letras distintas representan las diferencias significativas entre tratamientos $p < 0.05$ y datos resaltados en negritas indican los resultados mas altos y con diferencias estadísticamente significativas.

10. Conclusiones.

La hipótesis planteada fue correcta ya que al inocular con HMA, *Rhizobium etli* y HMA+Re las plantas de *Prosopis laevigata*, se vieron beneficiadas en su crecimiento y desarrollo, en donde el tratamiento de HMA favoreció significativamente la supervivencia, cobertura y ETR así mismo, *Rhizobium etli* obtuvo resultados significativamente mayores en altura, el número de pinas, el cociente R/V y la tasa de crecimiento relativo. Por último el tratamiento de doble inoculación HMA+Re resultó ser significativamente mayor en cuanto al uso eficiente del agua, la biomasa húmeda de raíz y vástago.

También hubo un mayor porcentaje de colonización micorrízica, lo cual podría indicar que la simbiosis con *Rhizobium etli* favoreció la colonización al presentar el mayor porcentaje de colonización obteniendo 78% comparado con el tratamiento inoculado únicamente con HMA el cual obtuvo un 76% de colonización micorrízica.

Los tratamientos inoculados con *Rhizobium etli* no presentaron nódulos, esto probablemente debido a que al tiempo de cultivo no fue suficiente para la formación de éstos, pero se comprobó la presencia de *Rhizobium etli* dentro de las raíces mediante la tinción Gram en donde se encontró la presencia de la bacteria.

11. Referencias

- Aguilar, M., Riva O., Peltzer, E. (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. p.13548-13553.
- Alarcón, A. (2005). Manual: tecnología de hongos micorrízicos en la producción de especies forestales en vivero, pronare-conafor, isbn: 9709179039.
- Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. (2000). Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. IRENAT. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Mundi Prensa, México. pp.16- 38.
- Azcón R. (2000). Papel de simbiosis micorrícica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. En: A. Alarcon y R. Ferrera-Cerrato (compiladores). Ecología, fisiología y biotecnología de las micorrizas. Colegio de Postgraduados. Montecillo. *Mundi Prensa*. México pp. 1-15.
- Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C. (1983). Mycorrhiza and their significance on nodulating nitrogen fixing plants. *Advances in Agronomy*. 36: 1-54.
- Behar A, Yuval B, Jurkevitch E. (2005). Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Molecular Ecology* .14:2637-2643.
- Brundrett, M. C. (1991), Mycorrhizas in natural ecosystems, *Advances in Ecological Research*, vol. 21, pp. 171–213.
- Calderón-Flores, A., Du Pont, G., Huerta-Saquero, A., Merchant-Larios, H., Servín-González, L., Durán, S. (2005). The stringent response is required for amino acid and nitrate utilization, Nod Factor regulation, Nodulation, and nitrogen fixation in *Rhizobium etli* *Journal of Bacteriology*. p. 5075-5083.
- Cervantes, M. (2002). Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. UNAM, Instituto de Geografía. 155 pág.
- Cervantes, C. (2013). Establecimientos de plantas de *Prosopis laevigata* y *Agave salmiana* inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares en condiciones de invernadero. FES Zaragoza. UNAM, México, D.F.
- Challenger, A., (1998), Utilización y Conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, Presente y futuro, comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, instituto de biología, Universidad Nacional Autónoma de México y agrupación sierra madre, S.C, pp:689-713.
- Charles E, Doley, D., Rimmington-Glyn, M. (1986), Modeling plant growth and development. Ed. Academic Press. pp. 21
- CONAZA. (1994). Mezquite *Prosopis*. Cultivo alternativo de zonas áridas y semiáridas de México. Comisión Nacional de Zonas Áridas-Instituto Nacional de Ecología, México 31p.
- Cui, M. y P.S. Nobel. (1992). Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with micorrhizal fungi. *New Phytol*. 122: 643-649.
- Dunn, M., Willms, K., Mora, J. (1995), Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*. *Journal of Bacteriology*. p. 3058-3066.
- Calvo. G. S. (2011), Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, Universidad de Salamanca, México.
- Daniels, B.A., Skipper, H.D. (1982). Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. En: N.C. Schenck (ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. American Phytopathological Society. St. Paul. pp. 29-35
- Dávila A., H. (1983). La distribución del mezquite en México. Segunda reunión nacional sobre ecología, manejo y domesticación de las plantas útiles del desierto. Subsecretaría Forestal, INIF, SARH, México.

- Deslippe R., Egger N. (2006). Molecular diversity of nifH genes from bacteria associated with high arctic Dwarf Shrubs. *Microbial Ecology* 51:516-525.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-González, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y. (2001). Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiology* 28: 1-9.
- Ezcurra, E., C. Montaña. (1988). La evolución del uso de los recursos naturales renovables del norte árido de México, en C. Montaña (ed.), Estudio integrado de los recursos vegetación, suelo y agua en la Reserva de la Biosfera de Mapimí, 1: Ambiente natural y humano. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, pp. 21-37.
- Fagg, C. W., Stewart, J. L. (1994). The value of *Acacia* and *Prosopis* in arid and semi-arid environments. *Journal of Arid Enviroments* pp: 27: 3-25.
- Ferrera CR, Pérez MJ. (1993). Manual de agrobiología Ed. Trillas, México. pp. 130.
- Ferrera CR, Pérez MJ. (1995). Agromicrobiología útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Cienecias Agrícolas. Montecillo, Estado de México. pp. 25
- Finlay R.D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extra radical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, 59:1115-1126.
- Flores, F. (1993). Atributos ecológicos y aprovechamiento del mezquite. *Revista Investigación y Ciencia de la UAA. Revista número 9, edición cuatrimestral, año 3*, pp. 24-30.
- Flores G.B. 2016. Evaluación del efecto de la simbiosis micorrízica sobre el crecimiento y metabolitos secundarios en *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiacea) en condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. México, D.F.
- Froni L. (1990). Ecología microbiana del suelo. Dpto. de Publicaciones Ediciones de la Universidad de La República. Montevideo. Uruguay, Pp: 1-12.
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 234-244.
- González-Monterrubio, C.F. Monroy Ata, A. Garcia Amador, E.M. Orozco-Almanza, M.S. (2005). Influencia de hongos micorrizógenos arbusculares en el desarrollo de plántulas de *Opuntia streptacantha* Lem. Sometidas a sequía, en condiciones de invernadero. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 8(1): pp. 5-10.
- Harley, J. L., Harley, E.L., (1987) A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora. *New Phytologist*, Vol. 105, No. 2, A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora Feb., pp. 1-102.
- Hernández C. L., Castillo A. S., Guadarrama, Ch. P., Martínez, O.Y., Romero, R. M. y Sánchez, G. I. (2003). Hongos Micorrizógenos Arbusculares del Pedregal de San Ángel. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- INEGI. (1999). Estadística del medio ambiente; Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente, 1997-1998. Tomo I. Capitulo II, pp. 61-76.
- Kowalchuck G., Stephen J. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria; a model form molecular microbial ecology. *Annual Review Microbiology* 55:485-529.
- Krishnan, H., Kang, B., Krishnan, A., Kim, K., Kim, Y. (2007). *Rhizobium etli* USDA 9032 Engineered to Produce a phenazine antibiotic inhibits growth of fungal pathogens but is impaired in symbiotic performance. *Applied and Environmental Microbiology*. pp. 327-330.
- Lamprecht, H. (1990). Silvicultura en los trópicos. Los ecosistemas forestales en los bosques 21 tropicales y sus especies arbóreas. Posibilidades y métodos para un aprovechamiento sostenido. GTZ. 335 pp.

- Luna Camacho, 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 licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. México Distrito Federal. pp. 92.
- Mahmood KW, Yang N, Kidhwar Z, Rajputy A, Arijó A. (2006). Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *J Shejiang Uni Sci* 7:459-466.
- Machlis, G. (1993). Áreas protegidas en un mundo cambiante: Los aspectos científicos. En *Parques y progreso*. UICN, BID. IV Congreso mundial de parques y áreas protegidas, Caracas, Venezuela. pp 37-53.
- Marschner, P., Marino, W., Liebercei, R. (2002). Seasonal effects on microorganisms in the rizosphere of two tropical plants in polyculture agroforestry system in Central Amazonia, Brazil.
- Meffe G. K., and C. R. Carroll. Eds. (1996). *Principles of conservation biology*. 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA
- Minamisawa K, Nishioka K, Miyaki T, Ye B, Miyamoto T, You M, Saito A, Saito M, Barraquio W, Teaumroog N, Sein T, Sato T. (2004). Anaerobic nitrogen fixing consortia consisting of *Clostridia* isolated from gramineous plants. *Applied Environmental Microbiology* 20:3096-3102.
- Montaño A. N. M., Monroy A. A. (2000). Conservación ecológica de suelos en zonas áridas y semiáridas en México. *Ciencia y Desarrollo* N° 154 Vol. 8 pp. 26-37.
- Montaño NM, Camargo-Ricalde SL, García-Sánchez R, Monroy A. (eds.) (2007). *Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems)*. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa SA de CV, UAM Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. Distrito Federal, México. 460 pp.
- Moris, M., Braeken, K., Schoeters, E., Verreth, C., Beullens, S., Vanderleyden, J., Michiels, J., (2005) Effective Symbiosis between *Rhizobium etli* and *Phaseolus vulgaris* Requires Alarmon ppGpp. *Journal of Bacteriology*. p. 5460-5469
- Mosset, B., Stribley, D. P., Le Tacon, E. (1981) Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi, *Advances in Microbial Ecology*, vol. 5, pp. 137–210.
- Palmer R. y Troeh F. (1979). *Introducción a la ciencia del suelo y manual de laboratorio*. Editor S.A. México.
- Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf> Fecha de consulta: 20/02/16.
- Parker, T.V. y S.T. Pickett. (1997). Restoration as an ecosystem process: implications of the modern ecological paradigm. En: Urbanska, K.M., N.R. Wobb y P.J. Edwards. *Restoratio Ecology and Sustainable development*. Cambridge University Press. U.K.
- Reyes Quintanar, C.K., Ferrera Cerrato, R., Alarcón, A. y Rodríguez, S.Z. (2000). Microbiología de la relación de nodricismo entre leguminosas arbóreas y *Neobuxbaumia tetetzo* en suelos no erosionados y erosionados en Zapotitlan de las Salinas, Puebla. IRENAT Colegio de postgraduados. Montecillos. Mundi Prensa, México.
- Phillips, J.M, Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vasicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55: 158-161.
- Rzedowski, J. (1988). Análisis de la distribución geográfica del Complejo *Prosopis* en Norteamérica, *Acta botánica mexicana*, núm. 3, México, pp. 7-9.
- Rzedowski de G.C, Rzedowski J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología A.C. México. Pp.250-253.

- Santillana N, Arellano C, Zuñiga D. (2005) Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* miller). *Redalyc* (1-2): 47-51.
- Schüßler. (2001). Analysis of partial *Glomales* SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research* 105. (1): 5-15. Doi: 10.1017/S0953756200003725.
- Sieverding, E. (1983). Manual de métodos para la investigación de las micorrizas arbusculares en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali.
- Smith, S.E, Gianinazzi-Person, V. (1998). Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Reviews of plant Physiology and plant Molecular Biology* 39: 221-244.
- Souchie JE, Saggin- Junior OJ, Silva MR, Campello EC, Azcon R, Barea JM. (2006). Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular micorhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty. *R J-Brazil* 78:183-193.
- Sprent J., Sprent P. (1990) Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman and Hall, Camdbrige. Great Britain. pp. 256.
- Torres, A. E. (2005). Establecimiento de plántulas de mezquite inoculadas con hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), bajo condiciones de sequía en un invernadero. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. pp 80.
- UACH. (2011) Actualización de la delimitación de zonas áridas, semiáridas y subhúmedas de México, a escala regional. Reporte final de proyecto de investigación. Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Valentine A, Osborne B and Mitchell D (2002). Form de nitrogen inorganic influence mycorrhizal colonisation and photosynthesis of cucumber. *Scientia Horticulturae* 92(3-4):229-239.
- Vázquez Castillo, H.M. (2014). Establecimiento de *Yucca filifera* (Agavaceae) inoculada con hongos micorrizógenos arbusculares en condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM. México, D.F.
- Wang, E.T.; Martínez Romero, J. López Lara, I. (2001). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. En: *Microbios*. (Eds. E. Martínez Romero y J.C. Martínez Romero). Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México
- WRI; UICN; PNUMA. (1992). Global biodiversity strategy. Washington, D.C., Instituto Mundial sobre Recursos (WRI).
- Webster´s New Collegiate Dictionary. (1977). G, C. Merriam Community, Springfield, MA.
- Zhang L, Hurek T., Reinhold H. (2007). A nifH-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-Fixing microorganisms. *Microbial ecology* 53: 456-470.
- Zehr, J. P., Mellon, M. T., Zani, S. (1998). New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (nifH) genes, *Appl. Environmental. Microbiology*, 64, 3444-3450.
- Zomlefer, W. B. (2001). Guide to Flowering Plant Families. University of North Carolina Press Chapel Hill a London. U. S. pp. 3-4, 160-164.