

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**



Propagación de cultivos puros de hongos micorrízicos arbusculares  
provenientes de la rizósfera de *Distichlis spicata* L. por la técnica de minirizotrófon

**POR**

**Edna Yolanda Arellanes Avila**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA**

**OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

**TORREÓN, COAHUILA, MEXICO**

**DICIEMBRE DE 2019**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN CARRERAS AGRONÓMICAS

Propagación de cultivos puros de hongos micorrízicos arbusculares  
provenientes de la rizósfera de *Distichlis spicata* L. por la técnica de  
minirizotrófon

POR:

**Edna Yolanda Arellanes Avila**

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito  
parcial para obtener el título de:

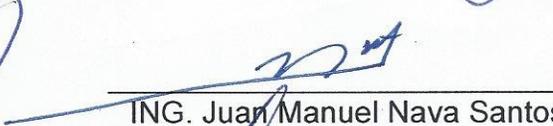
INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

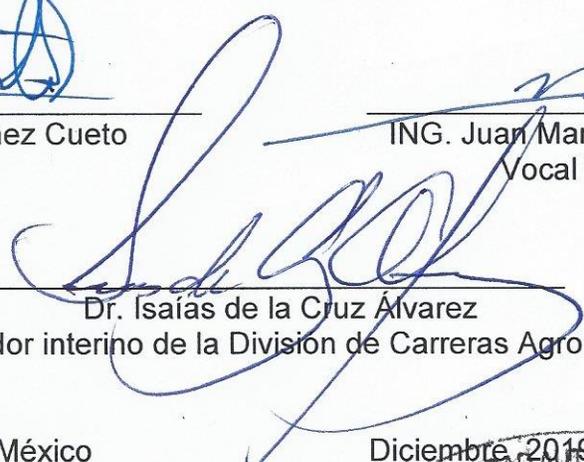
Aprobada por:

  
M.C. Genoveva Hernández Zamudio  
Presidente

  
M.E. Francisca Sánchez Bernal  
Vocal

  
M.E. Víctor Martínez Cueto  
Vocal

  
ING. Juan Manuel Nava Santos  
Vocal Suplente

  
Dr. Isaiás de la Cruz Álvarez  
Coordinador interino de la División de Carreras Agronómicas

Torreón, Coahuila, México



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**

**DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA**

Propagación de cultivos puros de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de la rizósfera de *Distichlis spicata* L. por la técnica de minirizotrón

**POR:**

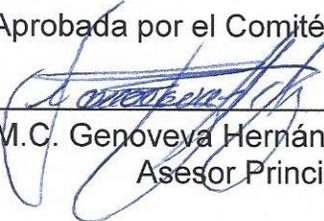
**Edna Yolanda Arellanes Avila**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

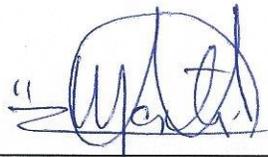
**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

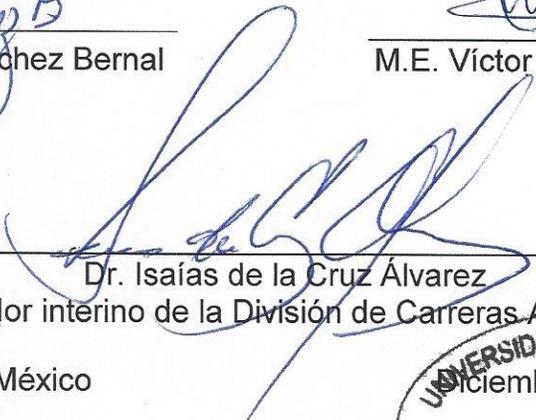
  
M.C. Genoveva Hernández Zamudio  
Asesor Principal

  
M.E. Francisca Sánchez Bernal

Coasesor

  
M.E. Víctor Martínez Cueto

Coasesor

  
Dr. Isaías de la Cruz Álvarez  
Coordinador interino de la División de Carreras Agronómicas

Torreón, Coahuila, México



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a Dios, que me ha brindado una vida llena de alegrías y aprendizaje, permitiéndome vivir una grata experiencia en esta etapa universitaria.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, por la oportunidad y las enseñanzas que me brindó.

A mi asesor de tesis M.C. Genoveva Hernández Zamudio, por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de esta tesis, por su confianza, apoyo, paciencia y amistad que me permitieron aprender mucho más que lo estudiado en el proyecto.

A mi tutora M.E. Francisca Sánchez Bernal, por su paciencia, consejos, apoyo, cariño.

A M.E. Víctor Martínez Cueto, por sus consejos, cariño y amistad.

A Ing. Juan Manuel Nava Santos, por su paciencia y apoyo.

Al Dr. Ángel Lagarda Murrieta, por facilitarme las instalaciones del laboratorio de Cultivo de Tejidos, para realizar parte de este trabajo.

A todos mis profesores de la carrera Ingeniero agrónomo en Horticultura, por compartir sus conocimientos, por su paciencia y cariño.

A mis compañeros del laboratorio de micorrizas, Santiago, Carmi y Lucio, por los días en el laboratorio que sin ustedes no serían lo mismo.

A mis compañeros de clases, muchas gracias por haber formado parte de mi vida estos 9 semestres, gracias por la compañía, paciencia, camaradería, cariño, por todo lo que me enseñaron, muchas gracias.

## **DEDICATORIAS**

Al amor de la vida, mi hijo Sergio Andrés, por su apoyo, cariño y paciencia, por estar incondicional a mi lado.

A mi Madre, que siempre está ahí, dando el ejemplo de ser mejor cada día, por sostenerme y echarme porras todos los días cuando sabe que apenas puedo.

A mis amores en el cielo, a mi hija Alyssa, a mi Padre y mi Esposo, que siempre están en mi corazón.

A mis hermanas Laura y Claudia, que son mis amigas incondicionales y mis compañeras de vida.

A mis hermanos Andrés, Pedro y Naty, por estar al pendiente de mis necesidades y me aman incondicionalmente.

A mis cuñados y cuñadas que se convirtieron en mis hermanos de corazón.

A mis sobrinos que los amo como hijos Kenneth, Russell, Andrés, Robert, Adrián, Alejandro, Alonso, Dante, Aimé, Lexi.

A mis sobrinas nietas, Mary Jane y Athena.

## RESUMEN

Se aislaron hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y raíces del suelo de la rizósfera de *Districhlis spicata* L., donde se obtuvieron cinco morfotipos, de los cuales solo se llevaron a propagación 4 por la cantidad de esporas encontradas, estas se propagaron por la técnica minirizotróf y como planta trampa pasto (*Lolium perenne* L.), evaluando la colonización micorrízica a los 60 y 90 días. Este sistema, resultó ser más efectivo con el inóculo de raíz, un 98% de colonización micorrízica en comparación con el cultivo puro que alcanzó un 96.99%. El sistema de minirizotróf resultó ser efectivo para la propagación de cultivos donde se utilizó como inóculo raíz y esporas

Los cultivos minirizotróf que se inocularon con los morfotipos de esporas y las raíces se trasplantaron a macetas trampa durante cuatro meses, y se utilizaron como plantas trampa tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y pasto (*Lolium perenne* L.). El método de minirizotróf resultó ser más eficiente para la colonización micorrízica. En el método de maceta trampa los morfotipos obtuvieron un porcentaje de micorrización mayor que la de las raíces. En las macetas trampa el pasto *Lolium perenne* L. como planta hospedera presentó mayor porcentaje de micorrización.

**Palabras clave:** Micorrizas, Minirizotróf, Cultivos puros, Morfotipos, inóculo

## ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and roots of the rhizosphere of *Distichlis spicata* L. were isolated, where five morphotypes were obtained, of which only 4 were propagated by the amount of spores found, these were propagated by the minirizotron technique and as a grass trap plant (*Lolium perenne* L.), evaluating mycorrhizal colonization at 60 and 90 days. This system proved to be more effective with root inoculum, 98% of mycorrhizal colonization compared to pure culture that reached 96.99%. The minirizotron system proved effective for the propagation of crops where it was used as root inoculum and spores

The minirizotron cultures that were inoculated with the spore morphotypes and the roots were transplanted into trap pots for four months, and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and grass (*Lolium perenne* L.) were used as trap plants. The minirizotron method proved efficient for mycorrhizal colonization. In the trap pots the morphotypes (spores) obtained a percentage of mycorrhization greater than that of the roots. *The Lolium perenne* L. grass as a host plant had a higher percentage of mycorrhization

Keywords: Mycorrhizae, Minirizotron, Pure cultures, Morphotypes, Inoculum

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	i
<b>DEDICATORIAS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Objetivo general</b> .....	3
<b>1.1.1 Objetivos específicos</b> .....	3
<b>1.2 Hipótesis</b> .....	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
<b>2.1 Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)</b> .....	4
<b>2.1.1 HMA y las plantas</b> .....	4
<b>2.1.2 La simbiosis micorrizica</b> .....	4
<b>2.1.3 Asociación simbiosis</b> .....	4
<b>2.1.4 Estructuras de los HMA</b> .....	5
<b>2.1.5 Mecanismo de colonización</b> .....	6
<b>2.2. Inóculo</b> .....	7
<b>2.2.1. Selección del inóculo</b> .....	7
<b>2.2.2 Producción de inóculo</b> .....	8
<b>2.2.3 Sustratos para propagar inóculos de HMA</b> .....	8
<b>2.3 HMA como biofertilizante</b> .....	9
<b>2.3.1 Fertilizantes minerales</b> .....	9
<b>2.4 Técnicas de propagación de inóculo</b> .....	10
<b>2.4.1 Minirizotron</b> .....	10
<b>2.4.2 Maceta trampa</b> .....	10
<b>2.5 Zonas áridas, semiáridas y la salinidad, en México</b> .....	11
<b>2.5.1 Zonas áridas, semiáridas</b> .....	11
<b>2.5.2. El estrés salino</b> .....	12

2.5.3. Efecto de la salinidad en las plantas.....	13
2.5.4. Simbiosis HMA – planta, tolerancia al estrés salino.....	13
2.6 <i>Distichlis spicata</i> L.....	13
2.7 Pasto ( <i>Lolium perenne</i> L.).....	14
2.8 Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	15
2.8.1 Origen.....	15
2.8.2 Importancia económica .....	15
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Área de muestreo.....	16
3.2 Muestreo de suelo.....	17
3.3 Aislamiento y selección de esporas.....	17
3.4 Obtención de raíces.....	18
3.5 Suelo agrícola estéril.....	18
3.6 Desinfección de la superficie de esporas y raíces .....	18
3.7 Desinfección de semillas .....	19
3.8 Cultivo en minirizotrófon.....	19
3.9 Macetas trampa .....	20
3.9.1 Desinfección de arena para maceta trampa .....	21
3.9.2 Cultivo en macetas trampa.....	21
3.10 Determinación del porcentaje de colonización micorrízica.....	22
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>23</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>30</b>
<b>VII. REFERENCIAS .....</b>	<b>31</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de muestreo de la Poza Salada que se encuentra ubicada en el Valle del Sobaco, en el municipio de San Pedro de las Colonias en el Estado de Coahuila México. Muestra la localización geográfica de los valles del Sobaco y Cuatro Ciénegas (Tomado de Czaja, et. Al., 2014). .....	16
Figura 2. Sitio del muestreo, la Poza Salada, Municipio San Pedro Coahuila, Coahuila, México. (Fotografía de Genoveva Hernández Zamudio) .....	17
Figura 3. Minirizotrones en cámara de crecimiento vegetal, minirizotrón a los tres meses.....	20
Figura 4. Producción de inóculo en maceta trampa, muestras de raíz en FAA, para determinar el porcentaje de colonización. ....	22
Figura 5. Morfotipos de las esporas más abundantes en la rizósfera de <i>spicata</i> L. ....	23

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de micorrización de la primera y segunda evaluación de los cuatro morfotipos de <i>Distichlis spicata</i> L. en minirizotrófon en <i>Lolium perenne</i> L. como huésped.....	23
Cuadro 2. Porcentaje de micorrización de la primera y segunda evaluación de raíz de <i>Distichlis spicata</i> L. en minirizotrófon en <i>Lolium perenne</i> L. como huésped.....	25
Cuadro 3. Porcentaje de micorrización de los cuatro morfotipos de <i>Distichlis spicata</i> L. tomate y pasto ( <i>Lolium perenne</i> L.) en maceta trampa en tomate ( <i>Solanum lycopersicon</i> L.) y pasto ( <i>Lolium perenne</i> L.) como plantas huésped.....	26
Cuadro 4. Porcentaje de micorrización de raíces de <i>Distichlis spicata</i> L. en maceta trampa en tomate ( <i>Solanum lycopersicon</i> L.) y pasto ( <i>Lolium perenne</i> L.) como plantas huésped.....	28

## I. INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos del phylum una asociación simbiótica con las raíces de alrededor de 80% de las plantas terrestres desde hace más de 460 millones de años (Hong *et al.*, 2012; Montañaño *et al.*, 2012; Schussler *et al.*, 2011). Estos hongos son los simbioses más indispensables en los ecosistemas Glomeromycota y forman (Lumini *et al.*, 2011).

Esto es debido a las ventajas que estos hongos le proporciona a la planta como: mejor aumento en la captación de agua, y minerales, sobre todo aquellos de baja movilidad como el fósforo y el nitrógeno además de aumentar su capacidad fotosintética, por esta razón la producción de la biomasa aumenta de forma considerable. La planta también se ve protegida de la entrada de patógenos, es por ello aumenta su resistencia a las enfermedades (Wehner *et al.*, 2010). Estas características son indispensables para la sobrevivencia de las plantas sobre todo en condiciones extremas, como los ecosistemas áridos (Calvo-Polanco *et al.*, 2013).

Es por ello que la selección e inoculación de hongos micorrízicos con funciones beneficiosas puede contribuir al establecimiento de plántulas y la recuperación de áreas degradadas, debido a que aceleran el desarrollo de la planta y aumentan la tolerancia al estrés del trasplante, además de que se restaura los ciclo de nutrientes (Angelini *et al.*, 2012; De Souza *et al.*, 2006; Soares y Carneiro, 2010).

La disponibilidad de inóculo de los HMA en grandes cantidades has sido el principal motivo de que su uso no se haya generalizado (De Souza *et al.*, 2006; Miranda, 2008). Su eficacia también es cuestionada por Paluch *et al.* (2013), quienes argumentan que la comunidad nativa de hongos micorrízicos promueve una mayor colonización de la raíz que la adición de inoculantes comerciales.

El método de minirizotróf, puede ser una herramienta útil para propagar los HMA en condiciones axénicas in vivo y resguardar colecciones de germoplasma. De esta manera, se pueden establecer como colecciones tipo, para conservar las propiedades esenciales de los HMA y para poder ser explotados como bioinoculantes, o con la finalidad de conservación de ecosistemas, o para elevar la productividad de agroecosistemas, además ser una fuente de recurso genético potencial para la investigación básica de este importante grupo de hongos del suelo (Carreón-Abud *et al.*, 2013).

Además de este inoculante monospórico, es posible producir inoculantes con diferentes especies nativas con mayor facilidad y velocidad. En comparación con el inoculante comercial, tiene un bajo costo, mayor diversidad taxonómica y el uso de especies localmente adaptadas (Schwartz *et al.*, 2006) esto aumenta las posibilidades de efectos positivos en la planta (Klironomos, 2003). El uso del inoculante de los HMA producido a partir del suelo forestal es el método más confiable y recomendado debido a su alta diversidad de especies, el potencial para acelerar la restauración ecológica del suelo y promover la germinación y el crecimiento de las plantas (Klironomos, 2003; Paluch *et al.*, 2013).

## **1.1 Objetivo general**

Obtener cepas puras de hongos micorrízicos arbusculares, a partir de esporas y raíces, aisladas de la rizósfera de *Districhlis spicata* L., propagándolas por medio de la técnica de minirizotróf y midiendo su capacidad infectiva (colonización micorrízica) para la obtención de inóculo.

### **1.1.1 Objetivos específicos**

- a) Evaluar el porcentaje de micorrización por morfotipos en minirizotróf.
- b) Evaluar el porcentaje de micorrización por fragmentos de raíz en minirizotróf.
- c) Determinar el porcentaje de micorrización por morfotipos en maceta trampa.
- d) Determinar porcentaje de micorrización por fragmento de raíz en maceta trampa..

## **1.2 Hipótesis**

Las esporas son mejor inoculante que las raíces.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)

#### 2.1.1 HMA y las plantas

Glomeromycota, es el filo de hongos que contiene todos los conocidos Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), han co-evolucionado con sus anfitriones ya que las plantas conquistaron el medio terrestre durante el Período Ordovícico más de 430 millones de años atrás (Stürmer, 2012). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) benefician a los ecosistemas terrestres en todo el mundo mediante el establecimiento de una asociación íntima con las raíces en la mayoría de las plantas: la simbiosis micorrízica (Johnson, 2010)

#### 2.1.2 La simbiosis micorrízica

Los hongos Micorrízicos arbusculares (HMA) son simbiosites obligados que viven en las raíces de aproximadamente el 80%-90% de las especies de plantas, la mayoría forman esporas en el suelo que son capaces de germinar y crecer a partir de un estado de reposo, al igual que en respuestas a diferentes condiciones edáficas ambientales (Giovannetti *et al.*, 2010), esta simbiosis es el intercambio recíproco de nutrientes que resulta un beneficio nutricional para ambos simbiosites donde el hongo adquiere el carbono de la planta y la planta obtiene nutrientes minerales del hongo como Fósforo (P), Nitrógeno, Calcio, Zinc, Cobre (Harrison *et al.*, 2010).

#### 2.1.3 Asociación simbiosis

En 1885, Frank propuso el término micorriza para describir un fenómeno común que observó en las raíces de ciertos árboles de los bosques templados de Norteamérica. Estos órganos eran diferentes morfológicamente de otras raíces

cuando se encontraban asociadas a hongos del suelo; de ahí proviene su nombre latino que significa raíz fungosa (Harley y Smith, 1983).

La simbiosis entre las plantas y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) es posiblemente el mutualismo más frecuente del mundo.

La gran mayoría de las plantas terrestres forman interacciones con los hongos micorrízicos arbusculares, en las cuales las plantas suministran a los hongos con carbohidratos, esenciales para la supervivencia y el crecimiento de hongos (Parniske, 2008). A cambio, los hongos proporcionan a sus plantas hospedadoras nutrientes minerales (por ejemplo, fósforo (P)) y otros beneficios como la protección contra bióticos (patógenos y herbívoros) y tensiones abióticas (p. ej., sequía) (Smith *et al.*, 2010). Esta asociación, que evolucionó mucho antes este mutualismos entre insectos o vertebrados (Leigh Jr, 2010), es acreditado con la conducción de la colonización de tierras por plantas, permitiendo la transferencia masiva de nutrientes a nivel mundial y el secuestro crítico de carbono (Bonfante y Genre, 2010; Smith *et al.*, 2010).

#### **2.1.4 Estructuras de los HMA**

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se caracterizan por presentar un crecimiento intra e intercelular en la corteza de la raíz y por formar dos tipos de estructuras, arbusculos y vesículas (Quilambo, 2003). Los arbusculos son hifas que se dividen dicotómicamente, son invaginados por la membrana plasmática de las células corticales y presentan periodos de vida cortos, mientras que las vesículas son estructuras de almacenamiento que se forman en la parte terminal de las hifas (Barker *et al.*, 1998). Los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no producen vesículas, en lugar de ellas forman células auxiliares (Peterson *et al.*, 2004).

### 2.1.5 Mecanismo de colonización

Las esporas pueden considerarse solamente uno de los tipos de propágulos de los hongos endomicorrízicos debido a que las raíces de las plantas se colonizan también por trozos de micelio activo que se ramifica para desarrollar la infección. El inicio de la colonización de la planta y con ello la formación de la simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo cuando las condiciones de temperatura y humedad son favorables (Bolan y Abbott, 1983) o bien mediante el crecimiento de hifas a partir de propágulos del suelo que se encuentran cerca del sistema radical susceptible.

El crecimiento del micelio se incrementa algunas veces debido a que los exudados de la raíz pudieran proporcionar sustratos adecuados para el desarrollo de las hifas después de que las reservas de nutrimentos sobre todo en las esporas, se hubieran agotado. Sin embargo, a pesar del crecimiento del micelio en presencia de raíces, las hifas no parecen tomar una dirección hacia ellas, sino hasta que se encuentran muy cerca, es decir unos pocos milímetros

La hifa finalmente tiene contacto con la célula epidérmica o un pelo radical y produce un apresorio ligeramente engrosado, a partir del cual se desarrollan ramificaciones infectivas cortas. Posteriormente se produce la penetración de la epidermis o del pelo radical mediante la presión ejercida por la hifa en crecimiento sobre la pared celular, lo cual hace que esta última se agarre alrededor de la hifa y se vuelva mucho más delgada en las células corticales. No se sabe si está involucrada la producción de enzimas por el hongo, pero parece probable que ocurra una alta actividad hidrolítica y se ha sugerido también que la entrada de la hifa a la raíz se facilita por la presencia de pectinasas (Bonfante *et al.*, 2004; Harley y Smith, 1983).

Una vez que la hifa penetra la raíz, generalmente entre las células epidérmicas, se dispersa también intercelularmente a lo largo de la corteza, alcanzando la segunda capa de células corticales. La colonización se vuelve intracelular (Safir, 1987) cuando la hifa degrada la pared de la célula e invagina la membrana para ramificarse luego dicotómicamente muchas veces y formar una estructura

parecida a un arbusto, denominada arbusculo, dentro de la célula. Este es el sitio donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre ambos simbioses (Harley y Smith, 1983).

Otras ramificaciones de las hifas intraradicales en algunos géneros de hongos endomicorrízicos, forman vesículas intercelulares que parecen ser reservorios de nutrientes dado que presentan gran cantidad de lípidos (Bowen, 1987). La vida media de un arbusculo en actividad es muy corta y varía entre dos y quince días, al cabo de los cuales se colapsa y permanece rodeado por el plasmalema de la célula vegetal, siendo encapsulado por material depositado en la zona interfacial proveniente presumiblemente del hospedero (Harley y Smith, 1983). Este continuo proceso de degradación de arbusculos a la vez que se forman otros nuevos es ventajoso para la planta, un arbusculo en degradación, lleno de nutrientes puede liberar su contenido a la célula de la raíz y a partir de allí distribuirse a toda la planta (Salazar-García, 2002). La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas y hongos por la superficie de la raíz y penetrar en ésta a intervalos irregulares (Sieverding *et al.*, 1991)

## **2.2. Inóculo**

### **2.2.1. Selección del inóculo**

Para obtener éxito en la simbiosis entre el hongo y la planta es indispensable hacer una selección de la especie micorrízica a inocular, ya que diversas especies presentan diferente infectividad dependiendo del hospedero con el que se asocie, por lo que es importante conocer los HMA de agroecosistemas específicos para reintroducirlos en dichos hábitats y promover el crecimiento vegetal (Cameron, 2010).

### **2.2.2 Producción de inóculo.**

El avance que se ha logrado en el tema de las asociaciones micorrízicas incluye también el desarrollo de técnicas que permiten la producción masiva de inoculante de alta calidad; sin embargo, siempre serán necesarios los estudios ecológicos para la selección de nuevas especies, e incluso de ecotipos de una misma especie adaptados a ambientes específicos (Manjares *et al.*, 2000).

### **2.2.3 Sustratos para propagar inóculos de HMA**

Para propagar a los HMA se utiliza comúnmente arena, la cual es un sustrato que permite alta colonización y producción de esporas; sin embargo, debido a su peso, el manejo en cantidades altas es difícil. Otros materiales usados para la propagación de estos hongos son turba, perlita, vermiculita, arcillas expansivas, diversos residuos forestales y agrícolas, y tezontle (Douds Jr *et al.*, 2010; Jakobsen *et al.*, 1992; Jarstfer y Sylvia, 1995).

En su mayoría, los sustratos se usan a granel, lo que incrementa su variabilidad. Según Anicua Sánchez *et al.* (2009), el tamaño de partícula es factor determinante para el desarrollo de las plantas, porque las propiedades físicas y químicas de los sustratos dependen de la granulometría de los componentes. (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2011) usaron mezclas de corteza exterior de coco granular: tezontle granular: piedra pómez con granulometría de 1-2 mm y proporción 75:25, y mediante estudios micromorfológicos mostraron que en estas mezclas hay un sistema de poros heterogéneo y distribución en bandas, lo que permitió la percolación y la retención de humedad óptima para el desarrollo de plántulas.

Hay poca investigación que considere el tamaño de partícula en la producción de inoculante de HMA en diferentes sustratos (Drew *et al.*, 2003; Gaur y Adholeya, 2000; Ridgway *et al.*, 2006).

Según Safir (1987), el sustrato ideal para la propagación de HMA debe permitir el establecimiento funcional de la simbiosis micorrízica y ayudar a la provisión

de agua y aire para el crecimiento de los simbioses involucrados. Además debe ser ligero, de bajo costo y con alta disponibilidad (Chávez *et al.*, 2000; González, 2002).

El inoculante está listo cuando se cumple el ciclo reproductivo de dichas plantas y es extraído conjuntamente con el sustrato, el cual incluye todos los propágulos infectivos del hongo micorrizógeno (esporas, raicillas infectadas y fragmentos de hifas). No obstante, este puede ser extraído en cualquier otro momento, en dependencia de la cantidad de propágulos existentes en el sustrato (Noda, 2009). Gómez *et al.* (1996) recomiendan el recubrimiento de las semillas para los cultivos de siembra.

## **2.3 HMA como biofertilizante**

### **2.3.1 Fertilizantes minerales**

El uso desmedido de fertilizantes minerales ha provocado desequilibrio y desbalance en el sistema suelo-planta, por disminución de las actividades microbianas y del potencial productivo de las cosechas (Charles y Martín Alonso, 2015), por otra parte, los agroquímicos en los productos hortícolas preocupan sobremanera al consumidor, sobre todo por su residualidad (Fernández, 2001). Tal problemática ha estimulado el rescate de alternativas orgánicas, las cuales resultan ser insumos ideales para mantener cosechas sanas, y a la vez, mejorar las propiedades químicas, físicas y biológicas de los suelos, para conservar su capacidad productiva.

#### **2.3.1.1 Biofertilizantes**

Dentro de las alternativas nutricionales, los biofertilizantes, como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), han sido muy eficientes como sustitutos del fertilizante mineral (Pérez, 2012; Sharafzadeh y Ordoorkhani, 2011; Smith *et al.*,

2011) y a su combinación con materia orgánica, se le atribuye una mayor eficacia, por tener un efecto sinérgico (Maya *et al.*, 2012; Saxena *et al.*, 2013).

La utilización de estos microorganismos resulta factible para cualquier sistema de producción agrícola debido a las funciones que realizan una vez que se asocian con las plantas; entre ellas encontramos: incremento en la absorción de nutrientes minerales y agua a partir de un aumento en el volumen de suelo explorado, mayor resistencia a las toxinas, incremento de la traslocación y solubilización de elementos esenciales, protección contra patógenos radicales y el aumento de la tolerancia ante condiciones abióticas adversas (sequía, salinidad, etc.)(Smith y Read, 2008).

## **2.4 Técnicas de propagación de inóculo**

### **2.4.1 Minirizotrón**

La técnica de cultivo por minirizotrón, ha recibido especial interés para caracterizar varios procesos biológicos tales como la producción de raíces finas, longevidad de raíces, incrementos en la colonización, reducir el parasitismo e incrementar las probabilidades de obtención de cultivos puros. El sistema reduce el área de crecimiento de raíces, incrementa la concentración de CO<sub>2</sub> de la atmósfera del sustrato y con ello promueve la ramificación de hifas germinativas incrementando la posibilidad de colonización. Posteriormente el sistema se trasplanta a macetas con el mismo sustrato en donde se incrementa el nivel del mismo y se promueve un mayor desarrollo vegetal, estimulando la esporulación (Ortega-Larrocea *et al.*, 2008).

### **2.4.2 Maceta trampa**

La propagación de cultivos puros de HMA, presenta muchas dificultades debido a la imposibilidad de cultivar hongos que forman esta simbiosis (Glomeromycota) en condiciones axénicas, pues hay que tomar en cuenta

aspectos como la capacidad del hongo para completar su ciclo de vida con suficiente producción de esporas y de estructuras intraradicales, características del género o especies considerados (Declerck *et al.*, 2005).

Las técnicas de propagación de HMA in vivo que se utilizan comúnmente, como son el cultivo trampa en maceta, el cultivo con diferentes sustratos, o el cultivo hidropónico, reducen significativamente la eficiencia del cultivo de hongos de una sola especie o de un conjunto reducido de especies (Ortega-Larrocea *et al.*, 2008), además de que presentan el riesgo de contaminarse con otras especies (Declerck *et al.*, 2005).

## **2.5 Zonas áridas, semiáridas y la salinidad, en México**

### **2.5.1 Zonas áridas, semiáridas**

Las zonas áridas y semiáridas de México ocupan entre 50% y 60% de la superficie total del país (Challenger, 1998). Estas regiones de baja precipitación pluvial anual son referidas usualmente como áridas, si su precipitación media anual es inferior a 250 mm, y como semiáridas si la lluvia media fluctúa entre 250 y 450 mm (Wang y Nobel, 1998). En estos ambientes, el clima y la topografía son los factores que determinan, en mayor medida, los patrones de distribución espacial y temporal de la vegetación en las comunidades vegetales (Valentin *et al.*, 1999).

La microbiota del suelo juega un papel fundamental en la regulación de los ecosistemas terrestres, influyendo en la productividad, diversidad y estructura de las comunidades vegetales (Van Der Heijden *et al.*, 2008). Entre los organismos que habitan en el suelo cabe destacar por su función ecológica los hongos micorrízicos arbusculares. El deterioro de los sistemas suelo-planta, en cuanto que afecta a las relaciones planta-microorganismos, desencadena un círculo vicioso de los efectos negativos. Si no hay plantas, se degrada la vida microbiota del suelo y si no hay propágulos, cualquier proceso natural o

inducido de revegetación presenta problemas para prosperar adecuadamente (Marulanda *et al.*, 2006).

### **2.5.2. El estrés salino**

La salinización de los suelos es uno de los mayores problemas no solo a nivel ecológico sino también agronómico. A nivel ecológico es la causante de la pérdida de comunidades naturales de las plantas y acelera los procesos de degradación del suelo y desertificación (Alguacil *et al.*, 2012). La salinidad es además el estrés abiótico que afecta negativamente al crecimiento vegetal y por lo tanto a la producción agrícola, además de limitar el uso de nuevas áreas potenciales de cultivo. Las plantas pueden clasificarse en base a su tolerancia a la salinidad como halófitas (tolerantes) y glicófitas (sensibles), habiendo grandes diferencias dentro de cada grupo en base al nivel de tolerancia (Läuchli, 1984).

Debido a que la mayor parte de los cultivos son glicofitos, el exceso de sales en el suelo ocasiona pérdidas importantísimas en explotaciones agrícolas (Pitman y Läuchli, 2002). Los factores ambientales están estrechamente relacionados con la distribución de las zonas afectadas por salinidad. Por lo tanto en los climas áridos y semiáridos, caracterizados por escasez de lluvias, temperaturas extremas y alta velocidad de evaporación (Brito, 2011) el principal factor limitante de la fertilidad de los suelos y la productividad de los cultivos lo constituye la salinidad (Evelin *et al.*, 2009). A nivel mundial hay más de 800 millones de hectáreas afectadas por la salinidad, más del 6% del área total de la superficie terrestre (Munns y Tester, 2008)

Además de las causas naturales, la actividad humana, en concreto las malas prácticas de cultivo y el riego, han contribuido al incremento alarmante de sales en el suelo (Mahajan y Tuteja, 2005).

### **2.5.3. Efecto de la salinidad en las plantas**

La salinidad del suelo tiene un efecto negativo en el establecimiento, crecimiento y desarrollo de las plantas (Evelin *et al.*, 2009): Las plantas que crecen en áreas afectadas por salinidad son sometidas a tres estreses fisiológicos: toxicidad iónica, estrés osmótico y desequilibrio nutricional (Munns y Tester, 2008).

### **2.5.4. Simbiosis HMA – planta, tolerancia al estrés salino**

La simbiosis HMA contribuye a incrementar la resistencia y tolerancia de las plantas a la salinidad, sequía, estado de deficiencia o exceso de nutrientes, exceso de metales pesados, degradación del suelo, etc. (Azcón-Aguilar y Barea, 2015).

## **2.6 *Distichlis spicata* L.**

El género *Distichlis*, cuyo nombre vulgar es “pasto salado”, caracteriza la flora de las áreas con suelos naturalmente salitrosos o salinizados artificialmente, desde las elevadas montañas hasta la orilla del mar (Pelliza *et al.*, 2005).

El pasto salado posee estructuras morfo-anatómicas que corresponden a adaptaciones funcionales capaces de explicar su capacidad de crecimiento en condiciones muy desfavorables para la mayoría de las plantas, por lo que Hansen (1977) definen a *D. spicata* L. como planta pionera en la sucesión ecológica. Dichos autores señalan la presencia en *D. spicata* L. de: a) fuertes, profundos y extendidos rizomas que facilitan el transporte de gases, agua y nutrientes, de los que brotan las cañas aéreas (Nicora, 1978); b) estomas protegidos por protrusiones de las células oclusivas y por papilas, estructuras que ayudan a controlar la evapotranspiración; c) microtelos, tricomas bicelulares con funciones de glándulas de sal, que participan en la regulación del equilibrio osmótico mediante la excreción de Na y K y d) vía fotosintética C4 evidenciada por la presencia de los caracteres Kranz (Pelliza *et al.*, 2005).

Comúnmente las plantas C4 crecen en lugares cálidos y húmedos (Ehleringer y Monson, 1993) pero el pasto salado caracteriza ambientes muy variados, aunque con el común denominador de tener suelos salinos.

### **2.7 Pasto (*Lolium perenne* L.)**

El raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) es una de las gramíneas forrajeras más cultivadas a nivel mundial debido a su amplia adaptabilidad. En Europa es la segunda especie con mayor superficie sembrada solamente después de los cereales (Sampoux *et al.*, 2013). Es común encontrar plantas de *L. perenne* en simbiosis con hongos endófitos del género *Epichloë*.

La planta hospedadora provee al hongo nutrientes y un medio de dispersión a través de las semillas; y el endófito promueve la síntesis de metabolitos secundarios que confieren protección a la planta contra el herbivorismo (Schardl *et al.*, 2013). Los principales alcaloides producidos en las gramíneas hospedadoras de endófitos *Epichloë* son cuatro: (1) lolitrenos, neurotoxinas que pueden ocasionar modorra del raigrás (ryegrass staggers); (2) ergovalina, vasoconstrictor causante de la festucosis del ganado; (3) peramina y (4) lolinas, con propiedades insecticidas (Clay y Schardl, 2002).

El perfil de alcaloides en la planta depende de la especie del hongo como de la planta hospedadora y la concentración puede variar dependiendo de factores de la planta y ambientales (Schardl *et al.*, 2013). Actualmente existen hongos endófitos que se utilizan en la mejora de diversas especies de gramíneas (Easton *et al.*, 2001). En especies forrajeras se seleccionan estirpes con capacidad para producir alcaloides que actúen como insecticidas y se evitan aquellas que produzcan metabolitos dañinos para el ganado.

## **2.8 Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

### **2.8.1 Origen**

El tomate es originario de la América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Sin embargo, su domesticación fue llevada a cabo en México. (Coveca, 2002).

### **2.8.2 Importancia económica**

El tomate es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. Es una de las especies hortícolas de gran importancia económica y nutricional; presenta altos contenidos de vitamina C, hierro y vitamina A. pocos productos agrícolas se presentan para tantos usos como el jitomate, debido a que se le puede usar como ingrediente en la cocina y consumo en fresco y procesado en forma de pasta, salsa, jugo, o polvo (Coveca, 2002).

Durante el año 2010 hasta el mes de octubre se comercializaron dos millones de toneladas a nivel mundial ocupando México el primer lugar de exportación de tomate con dos millones de toneladas y un ingreso de 12,700 millones de pesos anuales (Cázares, 2010).

El tomate es el principal cultivo en invernadero en México y el mundo (Calvin y Cook, 2005; Steta, 2004).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Área de muestreo

Las muestras se obtuvieron de la Poza Salada, dentro del Valle del Sobaco, en el municipio de San Pedro, Coahuila con coordenadas  $26^{\circ} 10' 54''$  N y  $102^{\circ} 42' 24''$  O. dentro de la ecorregión conocida como Desierto Chihuahuense, de clima árido, donde la temperatura en verano alcanza los  $44^{\circ}\text{C}$  y la precipitación es menor a los 250 mm anuales. Una vegetación dominada por matorral micrófilo y crasicáule. La poza tiene un área de aproximada de 700 m<sup>2</sup> con un pastizal halófilo alrededor.

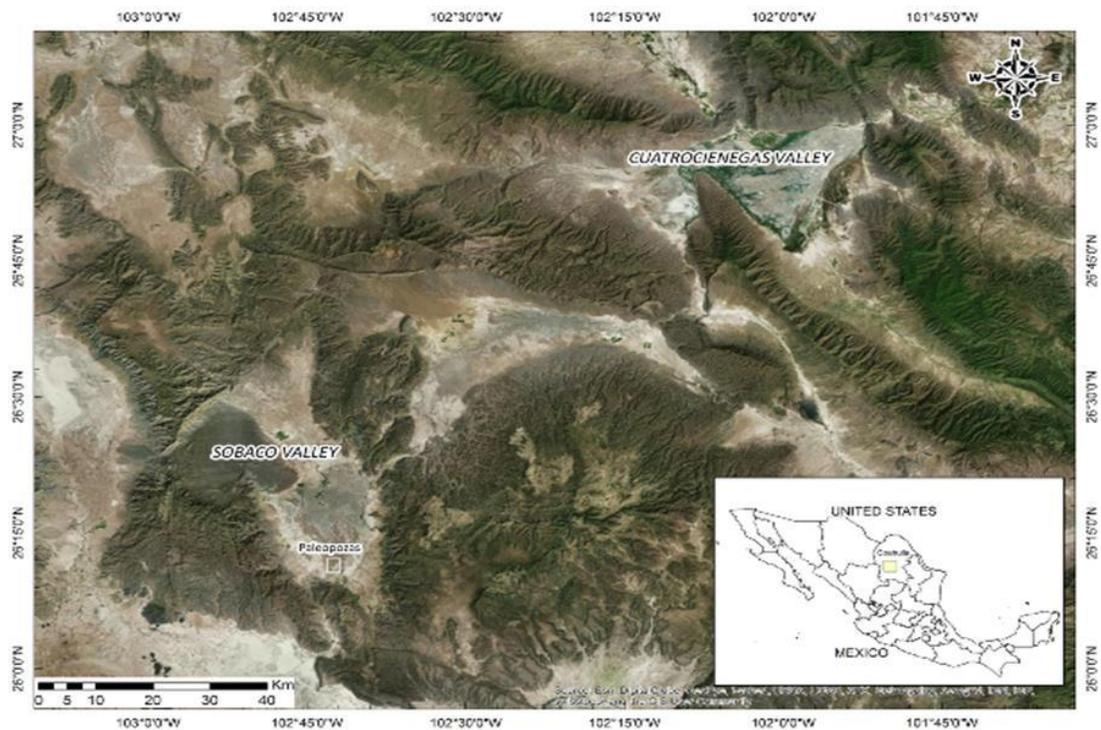


Figura 1. Área de muestreo de la poza salada que se encuentra ubicada en el Valle del Sobaco, en el municipio de San Pedro de las Colonias en el Estado de Coahuila México. Muestra la localización geográfica de los valles del Sobaco y Cuatro Ciénegas (Tomado de Czaja, et. Al., 2014).



Figura 2. Sitio del muestreo, la Poza Salada, Municipio San Pedro Coahuila, Coahuila, México. (Fotografía de Genoveva Hernández Zamudio)

Czaja et al. (2014) La situación geológica de El Valle del Sobaco es muy parecido al Valle de Cuatro Ciénegas, con suelos compuestos de sedimentos lacustres con alto contenido de carbono y yeso, estos valles están separados por alrededor de 70 km.

### **3.2 Muestreo de suelo**

Las muestras de suelo y de raíz se colectaron el día 13 de abril de 2018, de la rizósfera de *Distichlis spicata* L., a distancias de 1m, 3m y 6m, de la Poza Salada. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, donde se pusieron sobre papel secante a temperatura ambiente, durante 72 h. para su secado, posteriormente se almacenaron en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas a una temperatura de 4°C.

### **3.3 Aislamiento y selección de esporas**

Para el aislamiento de esporas utilizó el método seco se utilizó método de tamizado en húmedo y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963) en 100 g del suelo rizósferico, seguido por centrifugación en gradiente de sacarosa al 20 % y

60 % (Sieverding, 1983). Las esporas sanas se colocaron en una placa de Petri para la observación directa bajo un microscopio estereoscópico. Donde se separaron en base a sus características morfo-anatómicas, se conservaron 15 esporas por tubo eppendorf, para posteriormente desinfectarlas y sembrarlas en cajas Petri.

### **3.4 Obtención de raíces**

Se tamizo el suelo de la rizósfera de *Distichlis spicata* L., y se separaron las raicillas, las cuales ya estaban secas y se cortaron en piezas de aproximadamente 10 mm. Se conservó una cantidad 0.05 g por tubo eppendorf, y se les agrego agua estéril, para su posterior desinfección.

### **3.5 Suelo agrícola estéril**

La esterilización del suelo se realizó en autoclave a 120°C y 15 lb/in<sup>2</sup> durante 45 minutos.

### **3.6 Desinfección de la superficie de esporas y raíces**

Las esporas y raíces utilizadas como inóculo inicial se desinfectaron de la siguiente manera:

#### **PASO 1**

Con una jeringa de 10 ml, a cada uno los tubos eppendorf se le agrego 1 ml. de Twin al 0.05 %, se centrifugaron por 1 minuto, para que ocurriera la decantación para extraer con una pipeta esterilizada el sobrenadante.

#### **PASO 2**

Se aplicó a cada uno de los tubos eppendorf 1 ml. de Cloramine T al 2 %, a continuación a los tubos se les puso un tapón de goma para formarles un vacío,

con ayuda de una jeringa con aguja se extrajo el aire, se dejaron reposar por 10 minutos, después se llevó a centrifugar por un minuto, para que las esporas por medio de la decantación se vayan al fondo del tubo y fuera más sencillo extraerles el sobrenadante con una pipeta estéril.

### PASO 3

Se repite el proceso del Paso 2.

### PASO 4

Para enjuagar las esporas se utilizó Gentamicina 200 ppm, esta se agregó con

A cada uno de los tubos eppendorf se les agrego 1ml de Gentamicina 200 ppm, para enjuagar las superficie de las esporas y las raíces, se les dejo reposar por 1 minuto en este antibiótico, se llevaron a centrifugar por un minuto, se les extrajo el sobrenadante esto se repitió por 4 tiempos.

Después de llevar a cabo estos pasos, las esporas y raíces fueron refrigerados a 4° C.

Los pasos 2, 3 y 4 se hicieron bajo campana de flujo laminar.

Los pasos 2, 3 y 4 se repitieron una semana después.

Pero es necesario estandarizar la Tipo de agente desinfectante y concentración para diferentes hongos micorrizicos (Schenck y Perez, 1990). Bajo campana de flujo laminar.

### **3.7 Desinfección de semillas**

En cloro al 10 %, se agregaron las semillas, y se agitaron por 3 minutos, transcurrido este tiempo se colocaron las semillas en papel secante para retirar el exceso de agua.

### **3.8 Cultivo en minirizotrón**

Para realizar la inoculación se seleccionaron aquellos morfotipos aislados que presentaron mayor abundancia de esporas, con la finalidad de propagar la

mayor cantidad de réplicas posibles de un mismo inóculo. En cada caja de Petri se inocularon 15 esporas morfológicamente iguales, utilizando como planta trampa pasto *Lolium perenne* L. y como sustrato se utilizó suelo estéril con vermiculita en proporción 3:1. Las cajas se sellaron y cubrieron con papel aluminio. El sistema se mantuvo por un periodo de tres meses regándose cada tercer día, con jeringas de 10 ml, con agua destilada. Se mantuvieron en cámara de crecimiento (846 Thermo Scientific Countertop Educational Plant Growth Chamber) con un fotoperiodo de 12 horas luz/obscuridad.

La evaluación del porcentaje de micorrización se realizó en el sistema de minirizotrón a los dos meses (primera evaluación) ya los tres meses (segunda evaluación), seleccionando las plantas más vigorosas, dos macetas por tratamiento. Después de este tiempo se extrajeron algunas raíces de cada una de las cajas y se analizó la colonización.

Los minirizotrones que resultaron positivos se llevaron a la propagación en maceta trampa, después de esperar 5 meses para que se llevara a cabo la esporulación.



Figura 3. Minirizotrones en cámara de crecimiento vegetal, minirizotrón a los tres meses.

### 3.9 Macetas trampa

### **3.9.1 Desinfección de arena para maceta trampa**

Se utilizó arena de río cribada, la cual se desinfecto con hipoclorito de sodio al 0.2 ppm. Se aplicó riego diario a saturación por 4 semanas, para lavar el exceso de sales.

### **3.9.2 Cultivo en macetas trampa**

Para macetas trampa, se utilizaron bolsas de polietileno con capacidad de 3 kg; con la arena desinfectada y vermicomposta en proporción 3:1, se agregó el inóculo obtenido por el método de minirizotróf, como planta trampa se utilizaron 2 g semilla de pasto *Lolium perenne* L. y una plántula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad: Roma indeterminado var. Top 2299 de la compañía Top Seeds México.

El cultivo se estableció en el invernadero No. 3 del Departamento de Horticultura, el cual tiene una superficie de  $235m^2$ , cubierta de polietileno, suelo de grava y sistema de enfriamiento, consta de una pared húmeda base de celdek, dos extractores de aire en la parte frontal superior para la circulación de aire. Con coordenadas geográficas  $103^{\circ}25'57''$  de longitud oeste meridiano de Greenwich y  $25^{\circ}31'11''$  de latitud norte, con una altura de 1,123 msnm.

Transcurridos tres meses de establecido el cultivo, se extrajeron las raíces y se lavaron con abundante agua, y se pusieron en FAA (Formaldehído 37%: ácido acético: agua 1:1:1 V/V/V) y las conservaron hasta su posterior tratamiento.



Figura 4. Producción de inoculo en maceta trampa, muestras de raíz en FAA, para determinar el porcentaje de colonización.

### 3.10 Determinación del porcentaje de colonización micorrízica

Las raíces se lavaron cuidadosamente con agua del grifo y se cortaron en segmentos de 1 cm de largo, los segmentos de raíz se aclararon en KOH 10% (w / v) por 24 horas, dentro cassetes de inclusión histológica. Después las muestras de raíces se lavaron y se les agrego HCL por 10 minutos, posteriormente se tiñeron con azul de tripano al 0.05 % (Phillips y Hayman, 1970). Las raíces ya clareadas y teñidas se colocaron en portaobjetos y utilizando agujas de disección se colocaron 10 segmentos de aproximadamente 1 cm de largo, paralelamente unos a otros. Sobre las raíces se adicionaron gotas de lactoglicerol, colocando posteriormente el cubreobjetos.

La evaluación de las estructuras características de la micorriza arbusculares, se realizaron observaciones en el microscopio óptico a través del objetivo de 40X empleando el método de Phillips y Hayman (1970). Para ello se efectuaron 3 pasajes equidistantes por laminilla. Al revisar un campo óptico, se le otorgó el valor de 1 para la evaluación total toda vez que se encontró alguna estructura de los HMA (hifas, vesículas o arbusculos), independientemente de la intensidad de la micorrización, se le otorgara el valor de uno para la evaluación total y por estructuras (Phillips y Hayman, 1970).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 5, se observan los cuatro morfotipos (de esporas) aislado de la rizósfera de, *Distichlis spicata* (L.), por la técnica de minirizotrófon que presentaron mayor abundancia.

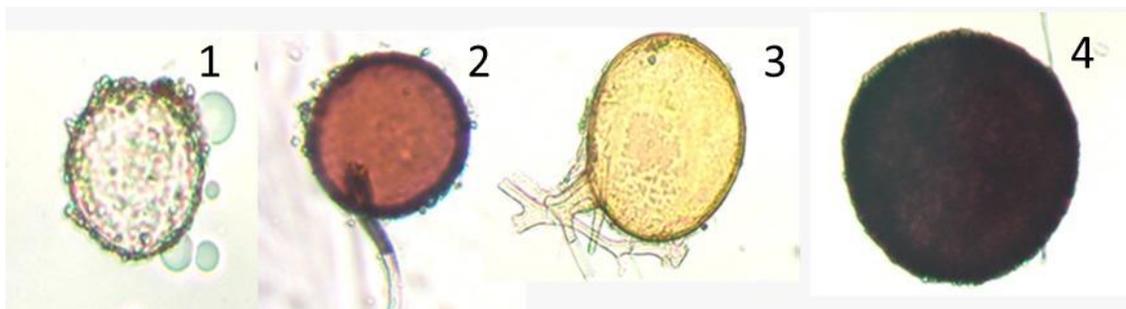


Figura 5. Morfotipos de las esporas más abundantes en la rizósfera de *Distichlis spicata* L.

Cuadro 1. Porcentaje de micorrización de la primera y segunda evaluación de los cuatro morfotipos de *Distichlis spicata* L. en minirizotrófon en *Lolium perenne* L. como huésped.

Segundo mes (primera evaluación)				
Morfotipos	Porcentaje Total	Hifas	Arbúsculos	Vesículas
1	90.83 a	90.83 a	26.67 a	14.16 a
2	87.33 a	85.83 a	30.83 a	15.83 a
3	99.08 a	99.08 a	33.33 a	14.16 a
4	95.74 a	95.74 a	20.00 a	5.83 a
Tercer mes (segunda evaluación)				
1	95.83 a	91.58 a	47.50 a	9.16 a
2	97.41 a	97.41 a	26.67 a	26.66 a
3	96.58 a	89.08 a	61.67 a	19.16 a
4	98.16 a	98.16 a	60.00 a	28.33 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

En el cuadro 1 reporta que no hay diferencias significativas en los porcentajes de micorrización de todas las estructuras de los HMA en la raíz y para el porcentaje total. En el segundo mes el morfotipo 3 fue el que presentó mayor porcentaje total de micorrización con un 99.08 % y el morfotipo 2 presentó el menor porcentaje total con un 87.33. Mientras que a los tres meses de establecido el minirizotrófon el morfotipo 4 fue el que presentó mayor porcentaje de micorrización con un 98.16 y el menor porcentaje de micorrización fue para morfotipo 1 con un 95.83. Los datos obtenidos para el minirizotrófon de la colonización total fueron altos en comparación con los reportados por Carreón-Abud *et al.* (2013) en su trabajo con *Brachiaria decumbens*, donde evalúa obteniendo un porcentaje de 12 en el inoculo puro y 75.3 en el consorcio a los 20 días, y 58.4 en el inoculo puro y 95 en el consorcio a los 40 días.

La efectividad de una cepa de HMA se manifiesta por su capacidad para colonizar a la planta huésped, influir de forma positiva en su crecimiento, desarrollo, contenido de nutrientes y rendimiento, y que la planta hospedante favorezca la multiplicación de los propágulos de dicha cepa en el suelo (Janos, 2007). Dado los altos porcentajes de micorrización de los morfotipos estudiados en este trabajo se muestra que tuvieron una alta capacidad para colonizar el pasto *L.perenne* L.

Cuadro 2. Porcentaje de micorrización de la primera y segunda evaluación de raíz de *Distichlis spicata* L. en minirizotrófon en *Lolium perenne* L. como huésped.

Segundo mes		(primera evaluación)		
Distancia(m)	Porcentaje Total	Hifas	Arbúsculos	Vesículas
1	77.91 a	57.91 b	30.82 a	34.16 a
3	78.87 a	70.82 ab	14.99 a	35.82 a
6	87.49 a	82.08 ab	25.83 a	13.74 b
Tercer mes		(segunda evaluación)		
1	96.66 a	96.66 a	17.92 a	12.82 b
3	99.58 a	97.87 a	39.58 a	17.91 ab
6	99.54 a	98.29 a	39.58 a	30.82 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

En el cuadro 2 se muestra que no existen diferencias significativas en el porcentaje total de micorrización, ni en arbúsculos entre raíces obtenidas en las tres distancias, el valor mayor para el porcentaje total de micorrización se observa para la distancia de 6 metros, y el menor en el de 1 metro, a los dos meses, mientras que el porcentaje total es mayor a los tres meses para la distancia de 3 metros. Mientras para los arbúsculos del segundo mes, el que obtuvo la mayor cantidad fue para la distancia de 1 metro con 30.82 por ciento, y el menor porcentaje fue para la distancia de 3 metros con 14.99. Para los tres meses de esta estructura, el que presentó el mayor porcentaje fue el de 3 metros con 99.58 y el menor para el de 1 metro con 96.66 %. Donde sí hubo diferencia significativa fue en las estructuras de hifas y vesículas, donde el mayor porcentaje de estructuras de hifas en el tiempo de dos meses fue para la distancia de los 6 metros al igual a los tres meses con 87.49 y 98.29 respectivamente. En vesículas, el que presentó mayor formación de estas estructuras en el segundo mes fue para la distancia de 1 metro y en el tiempo de tres meses fue para la distancia de 6 metros.

(Aguilar-Ulloa *et al.*, 2016), mediante el cultivo minirizotrófon, el consorcio fue altamente infectivo desde las primeras etapas, alcanzando el 95% de

colonización micorrízica, en comparación con el cultivo puro de *Sclerocystis rubiformis* que mostró porcentajes hasta de 58% al final del experimento.

Al igual que Aguilar-Ulloa *et al.* (2016) mayor colonización micorrízica se obtuvo del inóculo a base de raíces (forman un consorcio de esporas nativas) con 98.59 %, seguida de los inoculados con morfotipos con 96.99 %, en esta etapa final de minirizotróf.

Es importante resaltar que un inóculo con solo raíces colonizadas como propágulos infectivos, es de excelente calidad siempre y cuando se utilice de inmediato, porque sin la planta viva, el micelio colonizador muere en pocas semanas, aún almacenado en un ambiente fresco (Haas y Krikun, 1985). El método de minirizotróf, puede ser una herramienta útil para propagar HMA en condiciones axénicas in vivo y resguardar colecciones de germoplasma (Carreón-Abud *et al.*, 2013).

Cuadro 3. Porcentaje de micorrización de los cuatro morfotipos de *Distichlis spicata* L. tomate y pasto (*Lolium perenne*) en maceta trampa en tomate (*Solanum lycopersicon* L.) y pasto (*Lolium perenne* L.) como plantas huésped.

Morfotipos en tomate maceta trampa				
Morfotipos	Porcentaje Total	Hifas	Arbúsculos	Vesículas
M1	81.10 a	40.82 c	22.21 a	58.05 a
M2	72.49 a	42.49 bc	27.77 a	53.88 a
M3	83.32 a	61.66 ab	17.77 a	58.05 a
M4	77.21 a	70.82 a	16.66 a	17.21 a
Morfotipos pasto maceta trampa				
M1	91.38 a	84.71 a	17.77 ab	60.27 a
M2	89.99 a	79.16 a	19.71 ab	53.05 a
M3	94.99 a	86.66 a	11.10 b	48.60 a
M4	90.27 a	83.61 a	11.94 b	55.83 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

En el cuadro 3 se observa que no existe diferencia significativa para el porcentaje total, ni en las vesículas para los dos cultivos, presentando diferencias significativas en las hifas del tomate donde el mayor porcentaje se obtuvo para el morfotipo 4 con 70.82 y el valor más bajo lo obtuvo el morfotipo 1 con 40.82. Para el pasto en esta estructura no presento diferencias significativas. En cuanto a los arbusculos no presento diferencias para tomate. Pero en pasto si presento diferencias donde se observa el mayor porcentaje para el morfotipo 2 con 19.71 y el menor el morfotipo 3 con 11.10.

Loor y Zambrano (2018) en el experimento con plantas de achicoria se vieron afectadas significativamente por el aislado fúngico simbiótico inoculado donde, el morfotipo 1W1 tuvo una colonización radical de 48%, el morfotipo 1W3 un 35.8, y 2W3 un 45.8. Martín *et al.* (2010) en el trabajo con canavalia tuvo respuesta a la inoculación con las diferentes especies de HMA, un efecto diferenciado entre las cepas. La inoculación de *Glomus hoi-like* obtuvo el mayor porcentaje de colonización micorrízica con 75.75, seguido de *Glomus claroideum* 68.75 y *Glomus mosseae* con 65.25. Al igual que Loor y Zambrano (2018) y Martín *et al.* (2010), los morfotipos tuvieron diferencias en los porcentajes de micorrización según su especie.

Aguilar-Ulloa *et al.* (2016) en la investigación donde evalúan varios métodos de inoculación para producir micorrizas en cultivos trampa de vainica, observan que la inoculación con esporas presenta mayor porcentaje de colonización 75, en comparación con el inoculo de raíz, con 25. Estos datos concuerdan con este trabajo concuerdan con los obtenidos en este trabajo dado que los porcentajes de micorrización en las macetas trampa de *L.perenne* L. fueron mayores para las inoculadas con los morfotipos que para las inoculadas con raíces.

Cuadro 4. Porcentaje de micorrización de raíces de *Distichlis spicata* L. en maceta trampa en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y pasto (*Lolium perenne* L.) como plantas huésped.

Raíz de tomate maceta trampa				
Distancia (m)	porcentaje Total	Hifas	Arbúsculos	Vesículas
1	55.99 ab	21.10 a	16.88 a	45.99 b
3	50.86 b	6.88 b	9.70 a	47.55 b
6	72.26 ab	11.99 ab	15.10 a	67.77 a
Raíz en pasto maceta trampa				
1	75.33 a	60.44 a	13.47 b	40.88 b
3	72.66 a	69.77 a	28.66 a	55.77 a
6	78.66 a	67.99 a	18.21 b	37.99 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

En el cuadro 4 se puede observar que en la raíz de tomate hay diferencia significativa en el porcentaje total, teniendo los 6 metros la mayor micorrización con 72.26 y los 3 metros la menor con 50.86. En el porcentaje de hifas hay diferencia significativa, teniendo el mayor porcentaje la distancia de 1 metro con 21.10 y el menor los 3 metros con 6.88. La estructura de los arbúsculos no presento diferencia significativa. La estructura de las vesículas presento diferencia significativa obteniendo el mayor porcentaje los 6 metros con 67.77 y el menor 1 metro, con 45.99. El pasto *Lolium perenne* L. en maceta trampa no presento diferencia significativa en la micorrización en porcentajes totales y en hifas, no así en arbúsculos donde el mayor porcentaje lo presenta a los 3 metros con 28.66 y el menor a 1 metro con 13.47. En la estructura de vesículas presento diferencia significativa, donde el mayor porcentaje se obtuvo a los 3 m y el menor a los 6 metros.

Carreón-Abud *et al.* (2013) en lo que correspondió a los cultivos en maceta trampa, el consorcio de *Glomus* sp. y *R. aff. Intraradices*, se comportó igual que en el cultivo de minirizotrófon, ya que mostró mayores porcentajes en la colonización micorrízica, en comparación con el cultivo puro de *S. rubiformis*

que mostró porcentajes inferiores. En esta parte del trabajo realizado no concuerda con el de Carreón-Abud *et al.* (2013) porque se obtuvo mayor micorrización del inóculo de raíces.

La longitud de la raíz colonizada por los simbiontes micorrízicos es muy variable entre la combinación de huésped y hongo probada y depende de la identidad de la planta y el simbionte, la infectividad del aislamiento y las variables ambientales, como la luz, la temperatura y la humedad (Eissenstat *et al.*, 2015; Estaún *et al.*, 2010; Koide, 2000; Smith *et al.*, 2009).

## VI. CONCLUSIONES

El método de minirizotrófido resultó ser más eficiente para la colonización micorrízica.

En el método de maceta trampa los morfotipos obtuvieron un porcentaje de micorrización mayor que la de las raíces.

En las macetas trampa el pasto *Lolium perenne* L. como planta hospedera presentó mayor porcentaje de micorrización.

## VII. REFERENCIAS

- Aguilar-Ulloa, W., P. Arce-Acuña, F. Galiano-Murillo y T. J. Torres-Cruz. 2016. Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. *Revista Tecnología en Marcha* 5-14.
- Alguacil, M., E. Torrecillas, A. Roldán, G. Díaz y M. Torres. 2012. Perennial plant species from semiarid gypsum soils support higher amf diversity in roots than the annual bromus rubens. *Soil Biology and Biochemistry* 49:132-138.
- Angelini, G. A. R., A. Loss, M. G. Pereira, J. L. R. Torres y O. J. S. Júnior. 2012. Colonização micorrízica, densidade de esporos e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em solo de cerrado sob plantio direto e convencional. *Semina: Ciências Agrárias* 33(1):115-130.
- Anicua Sánchez, R., M. Gutiérrez Castorena, P. Sánchez García, C. Ortiz Solorio, V. H. Volke Halle y J. E. Rubiños Panta. 2009. Tamaño de partícula y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y zeolita. *Agricultura técnica en México* 35(2):147-156.
- Azcón-Aguilar, C. y J. Barea. 2015. Nutrient cycling in the mycorrhizosphere. *Journal of soil science and plant nutrition* 15(2):372-396.
- Barker, S. J., D. Tagu y G. Delp. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant physiology* 116(4):1201-1207.
- Bolan, N. y L. Abbott. 1983. Seasonal variation in infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to plant response to applied phosphorus. *Soil Research* 21(2):207-210.
- Bonfante, P. y A. Genre. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications* 148.
- Bonfante, P., A. Genre y V. Bianciotto. 2004. The colonisation strategies of arbuscular mycorrhizal fungi: An overview of their cellular interactions with plants and bacteria.
- Bowen, G. 1987. *The biology and physiology of infection and its development.*
- Brito, M. U. 2011. Factores del clima organizacional en las universidades de la costa caribe colombiana. *Omnia* 17(2):91-102.

- Calvin, L. y R. L. Cook. 2005. North american greenhouse tomatoes emerge as a major market force.
- Calvo-Polanco, M., B. Sánchez-Romera y R. Aroca. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi and the tolerance of plants to drought and salinity. En: R. Aroca (ed.) Symbiotic endophytes. Soil biology No. 37. p 271-288. Springer Berlin Heidelberg.
- Cameron, D. D. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi as (agro) ecosystem engineers. Plant and soil 333(1-2):1-5.
- Carreón-Abud, Y., E. Jerónimo-Treviño, M. d. I. Á. Beltrán-Nambo, M. Martínez-Trujillo, D. Trejo Aguilar y M. E. Gavito. 2013. Aislamiento y propagación de cultivos puros de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de huertas de aguacate con diferente manejo agrícola por la técnica de minirizotróf. Revista mexicana de micología 37:29-39.
- Cázares, C. 2010. Consejo nacional del sistema producto tomate. Primer foro de agronegocios, Centro de estudios de negocios y estratégicos del ITSON 190.
- Challenger, A. 1998. La zona ecológica templada húmeda (el bosque mesófilo de montaña). Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México, pasado, presente y futuro, A. Challenger (ed.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Universidad Nacional Autónoma de México/Agrupación Sierra Madre, México, DF443-518.
- Charles, N. J. y N. J. Martín Alonso. 2015. Uso y manejo de hongos micorrízicos arbusculares (hma) y humus de lombriz en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), bajo sistema protegido. Cultivos Tropicales 36(1):55-64.
- Chávez, M. G., R. F. Cerrato, A. V. Monter y J. Oropeza. 2000. Selección de sustratos de crecimiento en microplántulas de cítricos inoculadas con *Glomus* sp. Zac-19. Terra latinoamericana 18(4):0.
- Clay, K. y C. Schardl. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. The American Naturalist 160(S4):S99-S127.
- Coveca, C. 2002. Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria. Gobierno del Estado de Veracruz, México [in Spanish].

- De Souza, V. C., R. A. Da Silva, G. D. Cardoso y A. F. Barreto. 2006. Estudios sobre hongos micorrízicos. *R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental* 10(3):612-618.
- Declerck, S., S. Séguin y Y. Dalpé. 2005. The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for germplasm collections *In vitro* culture of mycorrhizas. p 17-30. Springer.
- Douds Jr, D. D., G. Nagahashi y P. R. Hepperly. 2010. On-farm production of inoculum of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and assessment of diluents of compost for inoculum production. *Bioresource technology* 101(7):2326-2330.
- Drew, E., R. Murray, S. Smith y I. Jakobsen. 2003. Beyond the rhizosphere: Growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes. *Plant and Soil* 251(1):105-114.
- Easton, H., M. Christensen, J. Eerens, L. Fletcher, D. Hume, R. Keogh, G. Lane, G. Latch, C. Pennell y A. Popay. 2001. Ryegrass endophyte: A new zealand grassland success story. In: *Proceedings of the conference-New Zealand Grassland Association*. p 37-46.
- Ehleringer, J. R. y R. K. Monson. 1993. Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24(1):411-439.
- Eissenstat, D. M., J. M. Kucharski, M. Zadworny, T. S. Adams y R. T. Koide. 2015. Linking root traits to nutrient foraging in arbuscular mycorrhizal trees in a temperate forest. *New Phytologist* 208(1):114-124.
- Estaún, V., C. Calvet y A. Camprubí. 2010. Effect of differences among crop species and cultivars on the arbuscular mycorrhizal symbiosis *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*. p 279-295. Springer.
- Evelin, H., R. Kapoor y B. Giri. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: A review. *Annals of botany* 104(7):1263-1280.
- Fernández, L. M. 2001. Producción controlada de cultivos protegidos. In: *El sector agrario y agroalimentario de Almería ante el siglo XXI: evolución y perspectiva de nuestra agricultura en el año 2000: producción integrada: incidencia de las nuevas normativas de residuos de plaguicidas sobre la horticultura almeriense*. p 201-210.
- Gaur, A. y A. Adholeya. 2000. Effects of the particle size of soil-less substrates upon am fungus inoculum production. *Mycorrhiza* 10(1):43-48.

- Gerdemann, J. W. y T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46(2):235-244.
- Giovannetti, M., L. Avio y C. Sbrana. 2010. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth—physiological and genetic aspects *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*. p 3-32. Springer.
- Gómez, R., N. MEDINA, R. RIVERA y F. FERNÁNDEZ. 1996. Principales resultados en la aplicación de biofertilizantes en cultivos de interés económico para cuba utilizando la tecnología de recubrimiento de semillas. IX Seminario del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Programa y Resúmenes. La Habana72.
- González, C. M. 2002. Producción y control de calidad de inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares. *Producción y Control de Calidad de Inoculantes Agrícolas y Forestales*. CMIAF, CP, INIFAP, SMCS. México36-46.
- Gutiérrez-Castorena, M., D. Carmen, J. Hernández Escobar, C. A. Ortiz-Solorio, R. Anicua Sánchez y M. Hernández Lara. 2011. Relación porosidad-retención de humedad en mezclas de sustratos y su efecto sobre variables respuesta en plántulas de lechuga. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 17(3):183-196.
- Haas, J. H. y J. Krikun. 1985. Efficacy of endomycorrhizal-fungus isolates and inoculum quantities required for growth response. *New Phytologist* 100(4):613-621.
- Hansen, G. 1977. Adaption to photosynthesis and diurnal oscillation of root respiration rates for *lolium multiflorum*. *Physiologia Plantarum* 39(4):275-279.
- Harley, J. L. y S. E. Smith. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press Inc.
- Harrison, M. J., N. Pumplin, F. J. Breuillin, R. D. Noar y H.-J. Park. 2010. Phosphate transporters in arbuscular mycorrhizal symbiosis *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*. p 117-135. Springer.
- Hong, J. J., Y.-S. Park, A. Bravo, K. K. Bhattarai, D. A. Daniels y M. J. Harrison. 2012. Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *brachypodium distachyon*. *Planta* 236(3):851-865.

- Jakobsen, I., L. Abbott y A. Robson. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with trifolium subterraneum I. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist* 120(3):371-380.
- Janos, D. P. 2007. Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* 17(2):75-91.
- Jarstfer, A. G. y D. M. Sylvia. 1995. Aeroponic culture of vsm fungi. En: A. Varma y B. Hock (eds.) *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. p 427-441. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Johnson, N. C. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist* 185(3):631-647.
- Klironomos, J. N. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84(9):2292-2301.
- Koide, R. T. 2000. Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The New Phytologist* 147(2):233-235.
- Läuchli, A. 1984. Responses and adaptations of crops to salinity. In: *Symposium on Tomato Production on Arid Land* 190. p 243-246.
- Leigh Jr, E. G. 2010. The evolution of mutualism. *Journal of evolutionary biology* 23(12):2507-2528.
- Loor, M. J. B. y L. J. S. Zambrano. 2018. Evaluación de la eficiencia de comunidades de hongos micorrízicos arbusculares. *Pro Sciences* 2(15):1-7.
- Lumini, E., M. Vallino, M. M. Alguacil, M. Romani y V. Bianciotto. 2011. Different farming and water regimes in Italian rice fields affect arbuscular mycorrhizal fungal soil communities. *Ecol Appl* 21(5):1696-1707.
- Mahajan, S. y N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of biochemistry and biophysics* 444(2):139-158.
- Manjares, M., A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrato. 2000. *Biología de la producción de inóculo micorrízico arbuscular y su control de calidad. Ecología, fisiología y biología de la micorriza arbuscular*, Montecillo, Colegio de Postgraduados, Mundi Prensa.

- Martín, G. M., L. Arias y R. Rivera. 2010. Selección de las cepas de hongos micorrízicos arbusculares (hma) más efectivas para la canavalia ensiformis cultivada en suelo ferralítico rojo. *Cultivos Tropicales* 31(1):00-00.
- Marulanda, A., J. Barea y R. Azcón. 2006. An indigenous drought-tolerant strain of glomus intraradices associated with a native bacterium improves water transport and root development in retama sphaerocarpa. *Microbial Ecology* 52(4):670.
- Maya, C., B. Roopa, H. Makari y K. Nagaraj. 2012. The synergistic effect of vam fungi with rhizobium on the growth and yield of cicer arietinum l. *Online International Interdisciplinary Research Journal* 2(1):16-20.
- Miranda, J. C. C. d. 2008. Cerrado: Micorriza arbuscular-ocorrência e manejo. Planaltina: Embrapa Cerrados 169.
- Montaño, N. M., A. Alarcón, S. L. Camargo-Ricalde, L. V. Hernández-Cuevas, J. Álvarez-Sánchez, M. d. C. A. González-Chávez, M. E. Gavito, I. Sánchez-Gallen, J. Ramos-Zapata y P. Guadarrama. 2012. Research on arbuscular mycorrhizae in mexico: An historical synthesis and future prospects. *Symbiosis* 57(3):111-126.
- Munns, R. y M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:651-681.
- Nicora, E. G. 1978. Gramineae. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Noda, Y. 2009. Las micorrizas: Una alternativa de fertilización ecológica en los pastos. *Pastos y Forrajes* 32(2):1-1.
- Ortega-Larrocea, M., V. Morales y S. García. 2008. Cultivos monospóricos de hongos micorrízicos arbusculares. Álvarez-Sánchez, J. Monroy, AA (Comps.). Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y su implicación de la restauración. Distrito Federal, México 69-83.
- Paluch, E. C., M. A. Thomsen y T. J. Volk. 2013. Effects of resident soil fungi and land use history outweigh those of commercial mycorrhizal inocula: Testing a restoration strategy in unsterilized soil. *Restoration Ecology* 21(3):380-389.
- Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* 6(10):763.

- Pelliza, A., L. Borrelli y G. Bonvissuto. 2005. El pasto salado (*distichlis* spp.) en la patagonia: Una forrajera adaptada a la aridez ya la salinidad. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Rev. Ci. Agropecuaria 9(2):119-131.
- Pérez, Y. M. 2012. Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (hma) por dos vías diferentes en el cultivo del tomate (*solanum lycopersicum* L.). Cultivos Tropicales 33(4):71-76.
- Peterson, R. L., H. B. Massicotte y L. H. Melville. 2004. Mycorrhizas: Anatomy and cell biology. NRC Research Press.
- Phillips, J. M. y D. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British mycological Society 55(1):158-168.
- Pitman, M. G. y A. Läuchli. 2002. Global impact of salinity and agricultural ecosystems Salinity: Environment-plants-molecules. p 3-20. Springer.
- Quilambo, O. A. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. African Journal of Biotechnology 2(12):539-546.
- Ridgway, H., J. Kandula y A. Stewart. 2006. Optimising the medium for producing arbuscular mycorrhizal spores and the effect of inoculation on grapevine growth. New Zealand Plant Protection 59:338-342.
- Safir, G. R. 1987. Ecophysiology of va mycorrhizal plants. CRC Press Boca Raton.
- Salazar-García, S. 2002. Las micorrizas pueden mejorar la nutrición del árbol. Nutrición del aguacate principios y aplicaciones.
- Sampoux, J., P. Baudouin, B. Bayle, V. Béguier, P. Bourdon, J. Chosson, K. De Bruijn, F. Deneufbourg, C. Galbrun y M. Ghesquière. 2013. Breeding perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) for turf usage: An assessment of genetic improvements in cultivars released in Europe, 1974–2004. Grass and Forage Science 68(1):33-48.
- Saxena, J., S. Chandra y L. Nain. 2013. Synergistic effect of phosphate solubilizing rhizobacteria and arbuscular mycorrhiza on growth and yield of wheat plants. Journal of soil science and plant nutrition 13(2):511-525.

- Schardl, C. L., S. Florea, J. Pan, P. Nagabhyru, S. Bec y P. J. Calie. 2013. The epichloae: Alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current opinion in plant biology* 16(4):480-488.
- Schenck, N. C. y Y. Perez. 1990. Manual for the identification of va mycorrhizal fungi. Synergistic Publications Gainesville.
- Schussler, A., M. Kruger y C. Walker. 2011. Revealing natural relationships among arbuscular mycorrhizal fungi: Culture line beg47 represents *diversispora epigaea*, not *glomus versiforme*. *PLoS One* 6(8):e23333.
- Schwartz, M. W., J. D. Hoeksema, C. A. Gehring, N. C. Johnson, J. N. Klironomos, L. K. Abbott y A. Pringle. 2006. The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecology letters* 9(5):501-515.
- Sharafzadeh, S. y K. Ordookhani. 2011. Organic and bio fertilizers as a good substitute for inorganic fertilizers in medicinal plants farming. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(12):1330-1333.
- Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio.
- Sieverding, E., J. Friedrichsen y W. Suden. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Sonderpublikation der GTZ (Germany).
- Smith, F. A., E. J. Grace y S. E. Smith. 2009. More than a carbon economy: Nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 182(2):347-358.
- Smith, S. y D. Read. 2008. Colonization of roots and anatomy of arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press: London 42-90.
- Smith, S. E., E. Facelli, S. Pope y F. A. Smith. 2010. Plant performance in stressful environments: Interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 326(1-2):3-20.
- Smith, S. E., I. Jakobsen, M. Grønlund y F. A. Smith. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in

arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant physiology* 156(3):1050-1057.

Soares, C. y M. Carneiro. 2010. Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas degradadas. *Micorrizas* 30441-474.

Steta, M. 2004. Mexico as the new major player in the vegetable greenhouse industry. In: VII International Symposium on Protected Cultivation in Mild Winter Climates: Production, Pest Management and Global Competition 659. p 31-36.

Stürmer, S. L. 2012. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum glomeromycota. *Mycorrhiza* 22(4):247-258.

Valentin, C., J.-M. d'Herbès y J. Poesen. 1999. Soil and water components of banded vegetation patterns. *Catena* 37(1-2):1-24.

Van Der Heijden, M. G., R. D. Bardgett y N. M. Van Straalen. 2008. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters* 11(3):296-310.

Wang, N. y P. S. Nobel. 1998. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *agave deserti*. *Plant physiology* 116(2):709-714.

Wehner, J., P. M. Antunes, J. R. Powell, J. Mazukatow y M. C. Rillig. 2010. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia* 53(3):197-201.