



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Opción Terminal: Agrícola

**“INFLUENCIA DE LA MICORRIZACIÓN Y MATERIA ORGÁNICA
EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS
BACTERICIDAS DEL AXIHUITL”**

Tesis para obtener el grado de Maestría en Producción Agropecuaria

Presenta:

BIÓL. SUSANA GARCÍA TÉLLEZ

Director de tesis

Doctor en Biología Molecular
y Biotecnología

LUIS LÓPEZ PÉREZ

Co-Director de tesis

Doctor en Microbiología, Biología
Vegetal y Biotecnologías

GABRIEL RINCÓN ENRÍQUEZ

Morelia, Michoacán, Junio de 2015.



El trabajo de esta tesis forma parte del proyecto intitulado

“Uso del axihuitl o hierba de agua (*Eupatorium* sp.) para control de enfermedades del nardo *Polianthes tuberosa* y cultivos ornamentales en agricultura protegida”

Financiada por el Fondo Mixto (FOMIX) de Fomento Científico y Tecnológico del Estado de Morelos-CONACYT, Convocatoria 2009. Clave del proyecto CONACYT MOR-2009-C02-120296.

Líder del proyecto: Dr. Gabriel Rincón Enríquez (CIATEJ).

La presente investigación se desarrolló en conjunto entre el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) A. C. y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH, bajo la codirección del Dr. Luis López Pérez y el Dr. Gabriel Rincón Enríquez y la asesoría de la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar.

De los resultados de esta tesis se han presentado los siguientes trabajos:

**XXV Congreso Nacional y V Congreso Internacional de Fitogenética 2014.
San Luis Potosí.**

Ponencia oral: **“Efecto de la materia orgánica y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento del axihuitl (*Eupatorium aschembornianum*)”**. Susana García-Téllez, Gabriel Rincón-Enríquez, Evangelina E. Quiñones-Aguilar, Luis López-Pérez.

**9º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación 2014. Morelia,
Michoacán.**

Ponencia oral: **“Influencia de la materia orgánica y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento del axihuitl (*Eupatorium aschembornianum*)”**. Susana García-Téllez, Gabriel Rincón-Enríquez, Evangelina E. Quiñones-Aguilar, Sylvia P. Fernández-Pavía, Nuria Gómez-Dorantes, Luis López-Pérez.

DEDICATORIA

A mi hija Laila, por ser mi fuente de motivación para superarme en todos los aspectos, por cederme parte de su tiempo de convivencia conmigo, para que yo lo empleara en hacer mis trabajos, estudiar y cuidar mis experimentos. Por tolerar mis cambios de humor, mis momentos de estrés, incluso, mis malestares físicos.

A mi mamá Martha, por todo su apoyo brindado en el cuidado de mi hija, por compartirme su vehículo, facilitando mi movilidad; por su apoyo económico, y moral.

A mi hermanos Pablo y Jorge, por apoyarme en el cuidado de mi hija y ayudarme en el mantenimiento de mi equipo de cómputo, principal herramienta para plasmar mi trabajo de tesis.

A Leonardo López Osuna, por estar al pendiente de Laila, por su apoyo económico y moral.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de becas CONACYT, al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) A.C y al programa de Maestría Profesionalizante del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH.

A mi mesa tutorial, por aceptar el ser partícipes de este trabajo de tesis, por sus conocimientos compartidos en las clases y por todo el tiempo que me dedicaron.

Al Dr. Luis López Pérez, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por apoyarme y brindarme su confianza.

Al Dr. Gabriel Rincón Enríquez, por su apoyo para llevar a cabo una estancia en el CIATEJ de Guadalajara, por instruirme en la preparación de mis experimentos, por alentarme siempre para que yo concluyera este trabajo.

A la Dra. Evangelina E. Quiñones Aguilar, también por su apoyo brindado mientras llevé a cabo mi estancia en el CIATEJ de Guadalajara, por sus recomendaciones, consejos e ideas, para llevar a cabo una mejor presentación de mi tesis.

A la Dra. Sylvia P. Fernández Pavia, por compartir espacios de su laboratorio, para que yo pudiera realizar mi trabajo experimental, por sus consejos y experiencias compartidas, tanto de trabajo, como de vida.

A la Mc. Nuria Gómez Dorantes, por su instrucción en el manejo de técnicas con los hongos micorrízicos arbusculares, por compartir sus experiencias escolares y por brindarme su apoyo en todo momento.

A la MC. Nayda L. Bravo Hernández, por su instrucción en el manejo del equipo de laboratorio, por sus consejos y por su apoyo durante la realización de mis experimentos.

A mi compañero de Maestría y amigo, Alfredo Reyes Tena, con quien a la par compartimos trabajo, clases, experiencias de vida, por su apoyo moral, por disipar mis dudas, por su ayuda en la preparación de mis experimentos y muestreos.

A mis compañeros y amigos de Maestría, Nayeli, Sinué, Yadira, Martín, Máximo, Josué y Julián, con quien compartimos no solo el proceso de la Maestría, también dudas, alegrías, tristezas y logros.

Al MC. Omar Champo, por sus consejos, charlas y apoyo moral.

A mis compañeros tesistas, Cristina, Dael, Iván, Sandi, Emilio, Saraí, Yolanda y Oneida, por su compañía y apoyo en el trabajo de laboratorio y muestreos.

A E. Seleste Gutiérrez Hernández, L. Patricia Briseño Aparicio y a su esposo José Antonio León Chávez, por su ayudarme en los momentos en que nadie podía asistir a mi niña y por cuidar de ella mientras me desocupaba de mi trabajo, por acompañarme en este proceso, y por escucharme en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I INTRODUCCIÓN	5
II ANTECEDENTES	8
2.1 Hongos micorrízicos arbusculares.....	8
2.2 Contribución de los HMA en las plantas y en el ecosistema.....	10
2.3 Materia orgánica.....	11
2.4 Efecto de la materia orgánica sobre el crecimiento de los HMA....	13
2.5 Metabolitos secundarios.....	15
2.6 Rutas de metabolitos secundarios.....	18
2.7 Efecto de los hongos micorrízicos, materia orgánica y nutrientes en la concentración de metabolitos secundarios.....	19
2.8 Axihuitl.....	21
2.9 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	23
III JUSTIFICACIÓN	25
IV HIPÓTESIS	27

V	OBJETIVOS	28
5.1	General.....	28
5.2	Específicos.....	28
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1	Germinación de la semilla.....	29
6.2	Material biológico.....	30
6.2.1	<i>Eupatorium aschembornianum</i> (axihuitl).....	30
6.2.2	Inóculos HMA.....	31
6.2.3	Fitopatógeno.....	32
6.3	Sustratos.....	32
6.4	Trasplante e inoculación.....	32
6.5	Diseño experimental.....	33
6.6	Primer experimento: Efecto de la materia orgánica y <i>Rhizophagus intraradices</i> en el crecimiento de las plantas y efectividad bactericida de los extractos de axihuitl sobre <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	33
6.7	Segundo experimento: Efecto de diferentes niveles de materia orgánica y distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento de las plantas y efectividad bactericida de los extractos de axihuitl sobre <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	34
6.8	Tercer experimento: Evaluación del efecto de seis inóculos de HMA, dos fuentes de materia orgánica y dos niveles de materia orgánica en el crecimiento y la concentración de sustancias bioactivas del axihuitl.....	35
6.9	Manejo de los experimentos.....	36

6.10	Variables de crecimiento vegetal evaluadas en los experimentos.....	37
6.10.1	Altura de la planta.....	37
6.10.2	Diámetro del tallo.....	37
6.10.3	Número de hojas.....	37
6.10.4	Longitud de raíz.....	38
6.10.5	Volumen de raíz.....	38
6.10.6	Área foliar.....	38
6.10.7	Pesos frescos.....	38
6.10.8	Pesos secos.....	38
6.11	Variables microbiológicas.....	39
6.11.1	Tinción de raíces.....	39
6.11.2	Porcentaje de colonización micorrízica (PCM).....	39
6.12	Obtención de extractos acetónicos de axihuitl.....	40
6.13	Pruebas de efectividad biológica: actividad bactericida.....	42
6.13.1	Reactivación de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	42
6.13.2	Crecimiento de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> con el extracto <i>in vitro</i>	42
6.14	Análisis Estadístico.....	44
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1	Efecto de la materia orgánica y <i>Rhizophagus intraradices</i> en el crecimiento de las plantas y efectividad bactericida de	

	los extractos de axihuitl sobre <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>...	45
7.1.1	Dinámica del crecimiento vegetal del axihuitl bajo condiciones de invernadero.....	45
7.1.2	Efecto de HMA y MO en el crecimiento de axihuitl observado en variables de respuesta de muestreo destructivo.....	50
7.1.3	Análisis de los factores HMA y MO para las variables de crecimiento del axihuitl.....	53
7.1.4	Extractos acetónicos de axihuitl y su actividad como bactericida...	54
7.2	Efecto de diferentes niveles de materia orgánica y distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y efectividad bactericida sobre <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> de plantas de axihuitl.....	56
7.2.1	Dinámicas del crecimiento vegetal del axihuitl por efecto de la MO y HMA.....	56
7.2.2	Efecto de HMA y MO en el crecimiento de axihuitl observado en variables de respuesta de muestreo destructivo.....	60
7.2.3	Porcentaje de colonización micorrízica.....	63
7.2.4	Análisis de los factores HMA y MO sobre las variables de crecimiento del axihuitl.....	65
7.2.5	Efecto de HMA y MO en la concentración de la actividad biológica bactericida de extractos acetónicos de axihuitl.....	66
7.2.6	Análisis de correlación entre el crecimiento vegetal, presencia de HMA e inhibición del crecimiento bacteriano por parte de extractos de axihuitl.....	68
7.3	Evaluación del efecto de seis inóculos de HMA, dos fuentes de materia orgánica y dos niveles de materia orgánica en el crecimiento y la concentración de sustancias bioactivas del axihuitl.....	69

7.3.1	Dinámica del crecimiento vegetal del axihuitl bajo condiciones de invernadero.....	69
7.3.2	Efecto de HMA y MO en el crecimiento de axihuitl observado en variables de respuesta de muestreo destructivo.....	74
7.3.3	Colonización micorrízica del axihuitl bajo distintos tratamientos de MO y HMA.....	78
7.3.4	Análisis de los factores HMA y MO para las variables de crecimiento del axihuitl.....	80
7.3.5	Pruebas de inhibición del crecimiento de <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> con extracto de axihuitl a una concentración de 60 mg mL ⁻¹ después de 24 horas.....	81
7.3.6	Pruebas de inhibición del crecimiento de <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> a una concentración de extracto de axihuitl de 40 mg mL ⁻¹ después de 24 horas.....	85
7.3.7	Pruebas de inhibición del crecimiento de <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> a una concentración de extracto de axihuitl de 80 mg mL ⁻¹ después de 24 horas.....	86
7.3.8	Análisis de correlación entre variables de crecimiento de axihuitl, inhibición de crecimiento bacteriano por extractos de axihuitl y presencia de HMA en las raíces de las plantas.....	90
VIII	DISCUSIÓN GENERAL.....	91
IX	CONCLUSIONES.....	93
X	PERSPECTIVAS.....	95
XI	BIBLIOGRAFÍA.....	96
XII	ANEXOS.....	110
12.1	Análisis fisicoquímico de la arena realizado por Servicios Analíticos Agroindustriales (SEANA).....	110

12.2	Ficha técnica de la composta.....	111
12.3	Ficha técnica de la vermicomposta.....	112
12.4	Trabajos presentados.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructuras arbusculares de hongos micorrízicos. A) Tipo Aurum. B) Tipo Paris.....	8
Figura 2. Aspecto general de plantas de axihuitl creciendo en su estado natural en Tepoztlán Morelos México.....	21
Figura 3. Semilla de axihuitl observada en microscopio estereoscópico (10x).....	30
Figura 4. Plántulas de axihuitl con sustrato arena-vermicomposta 5%...	30
Figura 5. Molienda de tejido seco de plantas de axihuitl en un molino eléctrico.....	40
Figura 6. Filtración y rotaevaporación de los residuos acetónicos del extracto crudo de axihuitl.....	41
Figura 7. Aspecto general del extracto acetónico de plantas de axihuitl.	41
Figura 8. Efecto de la materia orgánica sobre el crecimiento de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 80 días después de establecido el experimento.....	45
Figura 9. Efecto de HMA y vermicomposta sobre la altura de planta de axihuitl bajo condiciones de invernadero.....	47
Figura 10. Efecto de HMA y vermicomposta en el diámetro del tallo del axihuitl bajo condiciones de invernadero.....	48
Figura 11. Comparación de plantas de axihuitl a los 180 días de establecido el experimento.....	50
Figura 12. Efecto de la vermicomposta y HMA sobre el crecimiento de raíces de plantas de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 180 días de establecido el experimento.....	51
Figura 13. Estructuras de <i>Rhizophagus intraradices</i> en raíces de	

	plantas de axihuitl.....	52
Figura 14.	Prueba de inhibición del crecimiento de <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> por compuesto bactericida de extractos de axihuitl proveniente de distintos tratamientos.....	55
Figura 15.	Dinámica del crecimiento de la altura de la planta.....	57
Figura 16.	Dinámica de crecimiento del diámetro del tallo.....	58
Figura 17.	Efecto de la vermicomposta y HMA sobre el crecimiento de axihuitl a los 180 días de inoculadas.....	59
Figura 18	Efecto de los tratamientos sobre la longitud de raíz de axihuitl a los 180 días del establecimiento del experimento en invernadero.....	63
Figura 19	Estructuras de HMA en raíces de plantas de axihuitl colonizadas por HMA, tratadas con 5% de materia orgánica...	64
Figura 20.	Estructuras en raíces de plantas de axihuitl colonizadas por HMA, tratadas con 2.5% de materia orgánica.....	64
Figura 21.	Pruebas de inhibición bacteriana con extractos de axihuitl con una concentración de 60 mg mL ⁻¹	68
Figura 22.	Dinámica de crecimiento de altura de la planta.....	70
Figura 23.	Dinámica de crecimiento del diámetro del tallo.....	71
Figura 24.	Plantas de axihuitl 120 días después de establecido el experimento bajo condiciones de invernadero.....	73
Figura 25	Raíces de los 21 tratamientos a los 120 días de establecido el experimento.....	77
Figura 26.	Estructuras de micorriza arbuscular en raíces de plantas de axihuitl del tratamiento Antiguas vías del tren con cachaza al 5%.....	79
Figura 27	Estructuras de micorriza arbuscular en raíces de plantas de axihuitl del tratamiento Las Campesinas con suelo de Morelos 5%.....	79

Figura 28	Estructuras de micorriza arbuscular en raíces de plantas de axihuitl del tratamiento Tezontitla sin materia orgánica.....	80
Figura 29.	Pruebas de inhibición bacteriana después de 24 horas a una concentración del extracto de 60 mg mL ⁻¹ de plantas provenientes con distinto tratamiento con HMA/MO.....	84
Figura 30.	Pruebas de inhibición bacteriana después de 24 horas, a una concentración del extracto de 40 mg mL ⁻¹ de plantas provenientes con distinto tratamiento con HMA/MO.....	85
Figura 31.	Pruebas de inhibición bacteriana después de 24 h a una concentración del extracto de 80 mg mL ⁻¹ de plantas provenientes con distinto tratamiento con HMA/MO.....	88

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación de compuestos secundarios presentes en plantas según sus rutas biosintéticas.....	15
Cuadro 2. Inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) propagados en macetas trampa y empleados en los experimentos de este estudio.....	31
Cuadro 3. Tratamientos para evaluar el efecto de HMA y materia orgánica en el crecimiento de axihuitl.....	34
Cuadro 4. Diseño de tratamientos de inóculos de HMA de Michoacán, Morelos y comercial a distintos niveles de materia orgánica en plantas de axihuitl.....	35
Cuadro 5. Diseños de tratamientos de micorrización y materia orgánica con plantas de axihuitl bajo condiciones de invernadero.....	36
Cuadro 6. Efecto de HMA y vermicomposta en el número de hojas de la planta de axihuitl bajo condiciones de invernadero.....	49
Cuadro 7. Efecto de la materia orgánica y micorrizas en el crecimiento de las plantas de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 180 días después de establecido el experimento.....	51
Cuadro 8. Valores de probabilidad de los estadísticos de prueba del análisis de varianza para los factores HMA y MO en las distintas variables de crecimiento del axihuitl.....	54
Cuadro 9. Efecto de HMA y composta en el número de hojas de la planta de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 180 días de la inoculación.....	60
Cuadro 10. Efecto de los HMA y materia orgánica en las variables de crecimiento del axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 180 días después de establecido el experimento.....	61
Cuadro 11. Valores de probabilidad de los estadísticos de prueba del	

	análisis de varianza para los factores HMA y MO en las distintas variables de crecimiento del axihuitl.....	66
Cuadro 12.	Valores de coeficientes de correlación de Spearman (r) entre las variables de pesos fresco aéreo, peso seco aéreo, inhibición bacteriana y colonización micorrízica.....	69
Cuadro 13.	Efecto de HMA y composta en el número de hojas de la planta de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 120 días de la inoculación.....	72
Cuadro 14.	Efecto de los HMA y materia orgánica en las variables de crecimiento del axihuitl 120 días después de establecido el experimento bajo condiciones de invernadero.....	75
Cuadro 15.	Porcentajes de colonización micorrízica en las raíces de plantas de axihuitl 120 días después de establecido el experimento.....	78
Cuadro 16.	Valores de probabilidad de los estadísticos de prueba del análisis de varianza para los factores HMA y MO en las distintas variables de crecimiento del axihuitl.....	81
Cuadro 17	Resumen del efecto bactericida en tres diferentes concentraciones de extracto de axihuitl.....	89
Cuadro 18.	Correlación de Spearman (r) entre las variables de peso fresco y seco aéreo, inhibición bacteriana y colonización micorrízica para plantas de axihuitl bajo condiciones de invernadero.....	90

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos simbiotes obligados que al asociarse a las raíces de las plantas, les proporcionan ciertos beneficios como: una mejor captación de agua y de nutrientes, tolerancia a estrés hídrico, salino, por metales pesados entre otros. Esta asociación también puede modificar la concentración de metabolitos secundarios producidos por las plantas. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue, evaluar el efecto de distintos inóculos de HMA comerciales y nativos así como la materia orgánica (MO) adicionada al sustrato, sobre el crecimiento vegetal y la concentración de sustancias bactericidas producidas por plantas de axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.). Bajo condiciones de invernadero, se establecieron tres experimentos donde primero se evaluó: un inóculo comercial (*Rhizophagus intraradices*= RI) y dos niveles de vermicomposta (0 y 5%, v/v); en el segundo experimento se evaluaron tres inóculos de HMA nativos de Michoacán (Cerro de Metate, Las Campesinas y El Limón), un comercial (*R. intraradices*), un nativo de Morelos (Copalcohuatl) y tres niveles de composta de cachaza de caña 0, 2.5 y 5% v/v. Finalmente en el tercer experimento, se evaluó un inóculo de HMA comercial (*R. intraradices*), dos nativos de Michoacán (Las Campesinas y Cerro de Metate), tres de Morelos (Copalcohuatl, Tezontitla y antiguas Vías del Tren) y dos fuentes de materia orgánica al 5% v/v (composta de cachaza de caña y un sustrato rico en materia orgánica). En todos los experimentos, se midieron variables de crecimiento como: altura de planta, diámetro de tallo, número de hojas, área foliar, longitud y volumen de raíz, biomasa fresca y seca. Se tiñeron las raíces para observación y conteo de estructuras fúngicas y se extrajeron los metabolitos

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

secundarios. Los resultados mostraron que en el primer experimento, el tratamiento sin inóculo de HMA con vermicomposta al 5% presentó el mayor incremento en biomasa, mientras que el tratamiento *Rhizophagus intraradices* (RI) con vermicomposta al 5% tuvo un 26% de colonización micorrízica. En el segundo experimento, las plantas que presentaron mayor incremento en biomasa, fueron aquellas con el inóculo nativo Cerro del Metate con composta al 5%, mientras que el tratamiento Las Campesinas con composta al 5% presentó el mayor porcentaje de colonización micorrízica con el 93%. En el tercer experimento el tratamiento de RI con composta al 5% mostró el mayor incremento en biomasa, mientras que los tratamientos Antiguas Vías del Tren con cachaza 5% y Antiguas Vías del Tren con suelo de Morelos al 5% como fuente de MO, presentaron el mayor porcentaje de colonización micorrízica con el 61 y 60% respectivamente. Los extractos que mostraron una actividad bactericida a una concentración de 60 mg mL⁻¹ fueron: RI con 2.5% de MO; Cerro de Metate con 5% de MO y RI con composta al 5% y con suelo rico en MO al 5%. Estos tratamientos mostraron una inhibición del 100% del crecimiento bacteriano *in vitro*. En conclusión, las plantas que obtuvieron mayor incremento en la biomasa vegetal, fueron de los tratamientos con adición del 5% de MO y los tratamientos que mostraron incremento en los compuestos bactericidas, en general, fueron extractos de plantas con adición de inóculo y MO.

Palabras clave: hongos micorrízicos arbusculares, extractos vegetales, *Eupatorium aschembornianum* Sch, promotores de crecimiento.

Susana García Téllez: meyahue@hotmail.com
Luis López Pérez: lexquilax@yahoo.com.mx
Gabriel Rincón Enríquez: grincon@ciatej.mx

Influence of mycorrhization and organic matter in the growth and production of bactericidal substances axihuitl

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obliged symbiotic microorganisms that associated with the roots of plants. They provide them certain benefits such as: better uptake of water and nutrients, water tolerance, salt stress, heavy metals and others. This association can also modify the concentration produced by plants secondary metabolites. Therefore the aim of this study was to evaluate the effect of different inoculum of AMF and native commercial and organic matter (OM) added to the substrate, on plant growth and the concentration of antibacterial substances produced by plants axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.) Under greenhouse conditions, where the first three experiments were evaluated were established: a commercial inoculum (*Rhizophagus intraradices*= RI) vermicompost and two levels (0 and 5%, v / v); in the second experiment, three native AMF inoculum of Michoacan (Cerro del Metate, Las Campesinas and El Limón), commercial inoculum (*R. intraradices*), a native of Morelos (Copalcohuatl) and three levels of compost were evaluated cane rum 0, 2.5 and 5% v / v. Finally in the third experiment, a commercial inoculum AMF (RI), two natives from Michoacan (Las Campesinas and Cerro del Metate), three from Morelos (Copalcohuatl, Tezontitla and Antiguas vias del tren) and two sources of matter was evaluated organic 5% v/v (compost cane rum and a substrate rich in organic matter). Plant height, stem diameter, number of leaves, leaf area, root length and volume, fresh and dry biomass: In all experiments, as growth variables measured. The roots for observation and counting stained fungal structures and secondary metabolites were extracted. The results showed that in the first experiment, treatment without inoculum of HMA with 5% vermicompost had the highest increase in biomass, while the treatment RI with 5% vermicompost had 26% of

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

mycorrhizal colonization. In the second experiment, the plants had a higher increase in biomass, they were those with the native inoculum Cerro del Metate with compost 5%, while treatment with Las Campesinas with compost 5% had the highest percentage of mycorrhizal colonization 93 %. In the third experiment RI treating with compost 5% showed the greatest increase in biomass, while the treatments Antiguas vias del tren with cane rum 5% and Antiguas vias del tren with Morelos soil 5% as a source of MO, presented the highest percentage of mycorrhizal colonization with 61 and 60% respectively. The extracts showed bactericidal activity at a concentration of 60 mg mL⁻¹ were: RI with 2.5% of MO; Cerro del Metate with MO 5% and RI with compost-rich soil 5%. These treatments showed 100% inhibition of bacterial growth in vitro. In conclusion, the plants obtained greater increase in plant biomass were treatments with addition of 5% of MO and treatments showed increased bactericidal compounds generally plant extracts were added inoculum and MO.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi, plant extracts, *Eupatorium aschembornianum* Sch., growth promoters.

Susana García Téllez: meyahue@hotmail.com

Luis López Pérez: lexquilax@yahoo.com.mx

Gabriel Rincón Enríquez: grincon@ciatej.mx

I INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos del suelo que se asocian mutualistamente a las raíces de la gran mayoría de las plantas terrestres y les proporcionan ciertos beneficios como: tolerancia a estrés hídrico, salino, mejor captación de nutrimentos, tolerancia a metales pesados, protección contra patógenos, entre otras (Smith y Read, 2008). Además, promueven el incremento de la biomasa vegetal y modifican la concentración de metabolitos secundarios (Pedone *et al.*, 2012). Sin embargo, los efectos funcionales de la colonización de los HMA han sido examinados solo en aproximadamente un 10% de las plantas hospederas (Montaño *et al.*, 2012) y los trabajos relacionados con el estudio de la interacción micorriza arbuscular (MA) enfocados al incremento de los metabolitos secundarios en plantas, aún son insuficientes (Falcón *et al.*, 2013).

Actualmente se realizan evaluaciones de la respuesta en el incremento de la concentración de principios activos en plantas medicinales, cuando son inoculadas con los HMA (De la Rosa, 2009). Muchos de los compuestos naturales, derivados de los metabolitos secundarios contienen ingredientes medicinales (Lewinsohn y Gijzen, 2009), como en las especies del género *Eupatorium*, distribuidas en todo el mundo y cuyas propiedades han sido utilizadas como medicamentos tradicionales. De las 1 200 especies registradas, sólo se han investigado unas pocas hasta el momento, pero aún, muchas han recibido poca o nula atención en estudios fitoquímicos y biológicos, motivo por el cual debe enfocarse la búsqueda de los componentes bioactivos más potenciales (Li *et al.*, 2008). Ante este hecho, en la planta silvestre, conocida como axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.) se han encontrado compuestos con actividad bactericida, con base en pruebas realizadas en la especie bacteriana *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Godínez, 2012). Este fitopatógeno pertenece al grupo de bacterias que son

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

capaces de ocasionar daños graves a plantas de valor económico considerable (Young *et al.*, 2008). Por ello, el implemento del extracto del axihuitl como “bioplaguicida”, podría aplicarse en la agricultura orgánica y puesto que su origen es vegetal, es de bajo impacto ambiental. Puede beneficiar al ambiente, dado que a diferencia de los productos químicos, estos son biodegradables, lo que provoca un impacto mínimo sobre el ambiente, son efectivos contra enfermedades y no tienen restricciones toxicológicas (Chirinos, 2009). Pero en la búsqueda para mejorar el rendimiento y la calidad de material vegetal se debe hacer énfasis en el desarrollo de nuevas técnicas, que no sean un obstáculo en la explotación de los extractos por su baja concentración en los tejidos (Smith y Read, 2008). Tales técnicas, pueden incluir el uso de microorganismos benéficos para el suelo y que además estimulen el crecimiento de las plantas e influyan en el nivel de compuestos orgánicos, benéficos para una agricultura sustentable (Zubek *et al.*, 2010). Por este motivo y considerando que los HMA pueden modificar la concentración de los metabolitos secundarios, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares y diferentes niveles de materia orgánica sobre el crecimiento de las plantas de axihuitl, así como su efecto en la concentración de compuestos bioactivos sobre el crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Para ello, se establecieron experimentos en los que, se aplicaron distintos inóculos de HMA nativos del estado de Michoacán y de Morelos, así como un inóculo comercial, tres fuentes a tres concentraciones de materia orgánica en plántulas de axihuitl bajo condiciones de invernadero. Durante los experimentos se evaluaron diferentes variables de crecimiento y se realizaron pruebas microbiológicas para determinar la efectividad bactericida de los extractos del axihuitl, sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* en condiciones *in vitro*. La hipótesis del trabajo fue que, las plantas de axihuitl micorrizadas mostrarían una actividad bactericida (concentración mínima inhibitoria) menor a la reportada (80 mg mL⁻¹).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Los resultados mostraron que la materia orgánica fue un factor determinante en el crecimiento del axihuitl, debido a que las plantas a las que se adicionó 5% de MO fueron las que incrementaron su biomasa, con respecto a las que tuvieron menor porcentaje o ninguna adición de MO, así como en el incremento de los compuestos con efecto bactericida, lo cual se presentó en las pruebas, donde al menos en uno de los tratamientos que no tuvo inóculo de HMA, hubo incremento en los compuestos bactericidas.

II ANTECEDENTES

2.1 Hongos micorrízicos arbusculares.

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son biótrosos obligados, que viven simbióticamente en las raíces de alrededor del 80% de plantas terrestres. Pertenecen al Phylum *Glomeromycota* y comprenden 9 familias (Redecker *et al.*, 2013). Las plantas hospederas incluyen angiospermas, gimnospermas y pteridofitas (Simon *et al.*, 1993).

Un rasgo característico de estos hongos es la formación de estructuras altamente ramificadas llamadas arbuscúlos (Mukerji *et al.*, 2000), los cuales se producen dentro de las células corticales del hospedero, de las cuales existen dos tipos (Figura 1). Uno es el tipo *Aurum*, que consiste en la formación de los arbuscúlos característicos, mientras que el tipo *Paris* consiste en el desarrollo intercelular en espiral y también desarrollan estructuras llamadas vesículas, que se producen dentro o entre las células corticales radicales (Smith y Read, 1997), cuya función es la de almacenar reservas, para cuando exista una limitación energética para que siga creciendo el hongo, sin embargo estas estructuras no se forman en los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* (Carreón *et al.*, 2007).

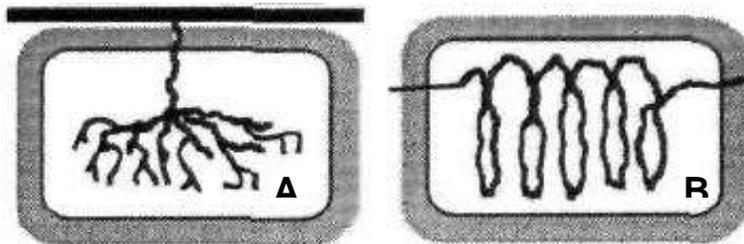


Figura 1. Estructuras arbusculares de hongos micorrízicos. A) Tipo Aurum. B) Tipo Paris.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Los HMA se encuentran en el suelo como esporas, las cuales son capaces de germinar y crecer una vez que se presenta una planta hospedante, así como las condiciones edáficas y ambientales favorables (Koltai y Kapulnik, 2010), igualmente también existen condiciones que inhiben la micorrización, como son las concentraciones elevadas de fósforo (P), presencia de metales pesados como zinc, cadmio y manganeso e incluso ácidos orgánicos, dependiendo también de la especie (Smith y Read, 1997), ya que especies como *Rhizophagus intraradices* ha presentado tolerancia a metales pesados como Pb y Cd (Alvarado *et al.*, 2011). También hay diversos hábitats o condiciones donde puede existir baja incidencia de micorrizas como son climas húmedos, zonas altamente perturbados, sobre todo en las primeras etapas de sucesión, en tundra y hábitats alpinos (Smith y Read, 1997).

El término micorriza proviene de las palabras griegas “mycos” y “rhiza”, que significa hongo-raíz, el cual fue acuñado, por primera vez por Albert Bernard Frank en 1885, botánico alemán quien además, mencionó que son tres los componentes funcionales básicos de la simbiosis micorrízica: (1) el micelio fúngico, que explora mayor superficie en el suelo; (2) la planta, interfaz donde se produce la transferencia de nutrimentos, (3) los tejidos vegetales, que producen y almacenan los hidratos de carbono (Mukerji *et al.*, 2000).

Se conoce que para que los HMA colonicen las raíces intervienen exudados de las mismas, las cuales desempeñan una función de comunicación con los HMA (Akiyama *et al.*, 2005). Los HMA colonizan las raíces de las plantas mediante el desarrollo de un apresorio sobre la superficie de la raíz y una vez que el hongo penetra, comienza a proliferar con la extensión de la hifa (Camarena, 2012).

Los HMA tienen una larga historia evolutiva y se tienen reportes de su existencia en la Era del Devónico. La distribución geográfica y biológica que presentan los hongos micorrízicos arbusculares, sugieren que este mutualismo fue fundamental en el origen de la flora terrestre (Mukerji *et al.*, 2000).

2.2 Contribución de los HMA en las plantas y en el ecosistema.

La asociación mutualista que establecen los HMA con las plantas confiere un efecto benéfico, donde los HMA proveen una mejor captación de los nutrientes minerales y de agua a través del micelio (Van der Heijden y Sanders, 2003), incrementan la longevidad, el tamaño y la biomasa de la raíz, características que permiten un aumento en la absorción y retención de nutrimentos, principalmente en lugares con baja disponibilidad de estos o que son infértiles (Cuadros *et al.*, 2011).

Los hongos micorrízicos parecen ser los principales mediadores del movimiento del nitrógeno (N) en el sistema planta-suelo, debido a que proporcionan el acceso a las formas orgánicas de N, que son por lo general más altas que las formas inorgánicas disponibles para las plantas (Hobbie y Högber, 2012). Así mismo, incrementan la tolerancia a estrés hídrico, debido al aumento en la exploración de mayor volumen del suelo realizado por el micelio extraradicular, las cuales penetran en poros reducidos e inaccesibles para las raíces, además que modifican la tasa fotosintética, la de transpiración y el potencial hídrico tanto de las hojas como del suelo (Harris *et al.*, 2009).

Por otra parte, también mejoran la eficiencia de absorción de nutrientes en suelos de baja fertilidad, incluso mejora la absorción de fósforo, el cual se encuentra en estos ambientes en una forma insoluble, como fosfato de calcio (Pedone *et al.*, 2012).

Al colonizar las raíces, los HMA tienen efecto en la inducción de mecanismos de defensa de la planta, denominada “resistencia sistémica inducida” (Van Loon *et al.*, 1998; Orujeia *et al.*, 2013). Una investigación reciente sobre los mecanismos que influyen en el reconocimiento de la planta-hongo mostró que *Rhizophagus intraradices* secreta una proteína, SP7, que contrarresta el sistema “inmunológico” de la planta, lo cual favorece la micorrización arbuscular (Martínez *et al.*, 2013). También se ha encontrado que los HMA tienen la capacidad de reducir el exceso

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

de absorción de la planta de ciertos metales pesados como cadmio, zinc y cobre, mediante la retención de estos metales por las hifas de las micorrizas (Joner *et al.*, 2009), así mismo, las plantas micorrizadas llegan a proporcionar tolerancia en las plantas bajo condiciones de estrés salino, debido a la mejora en la nutrición de la planta, hay una mejora en el ajuste osmótico y un uso eficiente del agua bajo salinidades elevadas en el suelo (Porcel *et al.*, 2012).

Los HMA en el ecosistema también son esenciales para la rehabilitación del suelo así como para la restauración o sustentabilidad de los agroecosistemas tropicales, de los cuales, se ha documentado en un estudio de más de 15 años que los HMA han contribuido en la restauración y regeneración de plantas en la selva tropical, contribuyendo además a través de su micelio externo a la agregación del suelo, a las actividades enzimáticas asociadas con otros microorganismos y su influencia en la fertilidad del suelo (Montaño *et al.*, 2012). También los HMA producen glomalina, que mejora la estructura del suelo al aglutinar partículas del suelo (Díaz *et al.*, 2014).

En ecosistemas áridos y semiáridos, la micorriza pueden proporcionar tolerancia en las plantas a la sequía (Montaño *et al.*, 2012) y otra de las bondades que resulta de la presencia de HMA en el suelo es la fitorremediación, debido a que pueden mejorar la adaptación y la supervivencia de las plantas en suelos contaminados, colocándose como una alternativa en la eliminación de contaminantes tóxicos (Fernández *et al.*, 2008).

2.3 Materia orgánica.

La materia orgánica proviene de la descomposición química de las excreciones de animales, así como de microorganismos y de los restos orgánicos de organismos, tales como plantas y animales (Julca *et al.*, 2006), la cual al descomponerse, por sus propias características en su composición, se forma el

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

humus, que enriquecerá al suelo y modificará algunas de sus propiedades y características como las reacciones del pH, quelación de elementos, disponibilidad de fósforo, calcio, magnesio y potasio, además de tener efectos en los microorganismos del suelo (SAGARPA, 2010).

Entre los productos derivados de la materia orgánica aplicados como fertilizantes biológicos, que actúan como sustitutos de fertilizantes químicos tradicionales, aplicados a los cultivos agrícolas (Carvajal y Mera, 2010), se encuentra la composta a base de cachaza de caña, la cual es rica en fósforo, calcio, nitrógeno y pobre en potasio, debido a que en el proceso de fabricación del jugo, es tratado con fosfato para su pronta clarificación. El contenido de calcio de la cachaza varía dependiendo de las cantidades de cal empleadas durante la clarificación del jugo, que usualmente es aplicada en dosis elevadas, mientras que los bajos contenidos de cal se deben a la gran solubilidad de este elemento. La cachaza presenta altos contenidos en nitrógenos, debido a la elevada cantidad de materia orgánica que presenta este residuo y los micronutrientes se derivan parcialmente de las partículas adheridas a la caña. Además, la cachaza también es fuente importante de micronutrientes como magnesio y zinc. Los efectos que presenta en el suelo son el incremento temporal de la capacidad de intercambio catiónico debido a la producción de humus, aumenta el contenido o la capacidad de retención de humedad y produce gran cantidad de CO₂, el cual, al transformarse junto con otros ácidos orgánicos, disolverán los nutrientes insolubles en suelos de pH alcalinos (Zérega, 1993).

Otro abono orgánico es la vermicomposta o lombricomposta, la cual se obtiene mediante la técnica de actividad biológica de lombrices, consistente en el aprovechamiento de la actividad metabólica de lombrices de tierra para producir humus con alto contenido de nutrientes. Para su obtención, se requiere de residuos orgánicos como cachaza, residuos de cosecha, etc. El material orgánico pasa a través del tracto digestivo de la lombriz, donde será transformado en un material rico en macro y micronutrientes (Carvajal y Mera, 2010).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

En general, los beneficios del uso de fertilizantes biológicos, radican en la movilización de nutrientes, favorecida por el desarrollo de la actividad biológica en el suelo; mantiene la salud de las plantas, la cual es favorecida por la adición balanceada de nutrientes; impulsa el incremento de microorganismos benéficos para el suelo; brinda buena estructura al suelo, favoreciendo el crecimiento de las raíces; favorece el desarrollo de asociaciones micorrízicas, lo que incrementa la disponibilidad de P en el suelo; contribuye al mantenimiento de concentraciones de N y P estables en el suelo, minimizando la lixiviación y mejora la capacidad de intercambio de nutrientes en el suelo (Carvajal y Mera, 2010).

2.4 Efecto de la materia orgánica sobre el crecimiento de los HMA.

Uno de los elementos más importantes que requieren las plantas, es el nitrógeno. Se ha encontrado que los HMA pueden afectar la absorción de este nutriente, dependiendo de la disponibilidad en que se encuentre en el suelo, ya sea, incrementando o reduciendo su absorción (Miransari, 2011), pero también, las propiedades del suelo donde se introducen los inóculos de HMA son factores que pueden determinar la respuesta que se desencadene en la plantas, dependiendo de la materia orgánica disponible. Los HMA pueden incrementar o disminuir su crecimiento (Gryndler *et al.*, 2009), sin embargo, las cepas de HMA seleccionadas, pueden ser clave del efecto del crecimiento en las plantas (Herrera *et al.*, 2011).

En estudios realizados sobre el efecto que puede tener la materia orgánica en el establecimiento de la simbiosis de los HMA con las plantas, se encuentra el estudio de Gryndler *et al.* (2009) donde se adicionó celulosa pura y alfalfa en el sustrato con diferentes días de descomposición en suelo no estéril, con y sin adición de N (139 mg) y P (103 mg) por kilogramo de suelo y HMA como testigo inocularon *Rhizophagus intraradices* en plantas de maíz, mostrando que la

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

colonización de HMA en la raíz bajo las concentraciones mencionadas con N y P, no es afectado, presentando el caso contrario con la adición de celulosa, debido a que los resultados obtenidos asociaron el crecimiento del micelio de los HMA con una fracción soluble de materia orgánica que se encuentra disponible en el suelo, la cual está relacionada con el ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico o ácido siríngico y aunque la celulosa es materia vegetal que puede ser descompuesta por microorganismos, es un sustrato complejo de degradar, sobre todo, tratándose de celulosa pura (Gryndler *et al.*, 2009).

La respuesta de la colonización de los HMA ha variado respecto a diferentes niveles de nutrición en el suelo, por ejemplo, cepas de *Glomus fasciculatum* y *Glomus etunicatum* establecieron una simbiosis en suelos relativamente ricos en nutrientes y materia orgánica, mientras que *Paraglomus occultum* y *Glomus mosseae* efectuaron la simbiosis en suelos relativamente pobres y *Glomus manihotis* prefirió una fertilidad media (Herrera *et al.*, 2011). En cultivos de platanera, se utilizó una fertilización fosforada y se aplicó la cepa *Rhizophagus intraradices*, misma que alcanzó niveles elevados de colonización, considerando en términos generales, que la micorrización es inhibida en suelos con alto contenido de P (Rosales *et al.*, 1998). Este hongo presentó un nivel de colonización del 50% en dos especies de plantas forestales *Albizia cubana* (Bacona) y *Swietenia macrophylla* (caoba de honduras), con un suelo Pardo sialítico carbonatado (según clasificación de suelos de Cuba, MINAGRI) como sustrato, el cual se agrupa en suelos de fertilidad media y que además demostró efectividad en este tipo de suelo, incluso superando a las plantas obtenidas en los tratamientos, los cuales son recomendados en las normas técnicas de porción de suelo por materia orgánica (5:1) que contienen mayor porcentaje de materia orgánica que en la porción de (7:1) utilizada en los experimentos que tuvieron mayor efectividad (Falcón *et al.*, 2013).

2.5 Metabolitos secundarios.

Las plantas, a diferencia de otros organismos, utilizan una enorme cantidad de carbono asimilado y de energía para la síntesis de una gran variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, lípidos o carbohidratos. A este conjunto de reacciones químicas llevadas a cabo en las células de los seres vivos, donde se sintetizan sustancias más complejas a partir de otras más simples, se le conoce como metabolitos secundarios (Ávalos y Pérez, 2009) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de compuestos secundarios presentes en plantas según sus rutas biosintéticas (Pérez y Jiménez, 2011).

Compuestos procedentes de metabolismo secundario	
Terpenos	Monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, esteroides.
Compuestos fenólicos	Ácidos fenólicos, cumarinas y taninos.
Alcaloides	Isoquinoleicos, indólicos, quinoléicos, piridínicos y piperidínicos, derivavos de tropano y esteroides.
Glicósidos	Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.

Se calcula que las plantas producen aproximadamente 100 000 metabolitos secundarios, de los cuales, son descritas cada año, unas 1 600 estructuras con actividad biológica, motivo que hace al estudio de estos compuestos orgánicos un enorme reto para su estudio y la implementación de diversas tecnologías para su producción (Karlovsy, 2008; Pérez y Jiménez, 2011; Lingua *et al.*, 2013).

Los metabolitos secundarios se encuentran distribuidos entre los diferentes grupos taxonómicos de plantas. Son varias las funciones que desempeñan en las plantas:

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Defensa contra depredadores y ataque de patógenos: algunas especies vegetales, ante la respuesta de hipersensibilidad al momento de ser atacadas por patógenos, producen compuestos como terpenoides y fenilpropanoides, que participan matando directamente a los microorganismos patógenos, así mismo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa, mientras que los conjugados de fenilpropanoides con aminas aumentan rigidez en las hojas para reducir la digestibilidad por insectos y herbívoros, así como, algunos alcaloides son neurotóxicos a insectos y vertebrados herbívoros (Sepúlveda *et al.*, 2004).

Adaptación a rayos UV: se han documentado distintos mecanismos de adaptación a rayos UV, como la producción y acumulación en células epidérmicas de fenoles y flavonoides, inducidos por este tipo de radiación, que son capaces de absorber la radiación entre los 280-360 nm, sin interferir en la fotosíntesis (Carrasco, 2009). Mientras que para la alelopatía, compuestos de metabolitos secundarios son liberados por las plantas al medio ambiente, influenciando en el crecimiento, desarrollo y reproducción de otros organismos, en sistemas naturales y agroecosistemas. Un ejemplo de alelopatía es cuando estos compuestos tienen efectos de defensa en las plantas contra la herbivoría (Cheema *et al.*, 2013).

Otras de las funciones que los compuestos del metabolismo secundario desempeñan en las plantas, es la determinación de color en las flores, frutos: como atrayentes, tanto a polinizadores, como a animales dispersores de semillas (Lingua *et al.*, 2013). Sin embargo, aún se desconoce la función de muchos compuestos derivados del metabolismo secundario (Hounscome *et al.*, 2008).

Empíricamente, el hombre, ha aprovechado dichas propiedades que utilizan las plantas para repeler o eliminar a las plagas que afectan sus cultivos, por lo cual en algunos países se incentiva a utilizar extractos obtenidos en forma directa de

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

las plantas, ya sea por su efectividad, bajo costo de preparación, fácil obtención y su degradación (Chirinos, 2009).

Como ejemplos del uso de extractos de plantas en el control de enfermedades, se han utilizado extractos de pimienta (*Piper nigrum*), ajo (*Allium sativum* L.), helecho (*Pteridium aquilinum* L.), eucalipto (*Eucalyptus melliodora*), bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*) entre otras, así como extractos comerciales, por ejemplo, ecolife-40, extracto cítrico que contiene fitoalexinas, bioflavonoides y ácido ascórbico, que son usados contra fitopatógenos (Bettiol, 2006) y milsana obtenido de *Reynoutria sachalinensis*, que es un extracto eficiente en el control del hongo que causa la enfermedad de oidio conocida como cenicilla (manifestándose como polvo blanco o cenizo) de cucurbitáceas y rosales (Pasini *et al.*, 1997).

De plantas medicinales como la moringa (*Moringa oleífera*) se han probado sus extractos en la eficacia sobre la actividad antifúngica y antibacteriana en cultivos agrícolas, debido a la presencia de alcaloides, glucósidos, ácidos grasos, péptidos y niazirinas (Cheema, 2013).

También se han probado mezclas de extractos de diferentes plantas en la inhibición de patógenos, teniendo resultados positivos en la inhibición por efecto de los compuestos fenólicos de ácido cinámico y naringenina (Boiteux *et al.*, 2014). Extractos de las plantas *Prosopis juliflora*, *Oxalis corniculata* y *Lawsonia inermis* presentaron actividad antibacteriana sobre diferentes patovares de *Xanthomonas campestris*, una bacteria causante de enfermedades en algunos cultivos de importancia agrícola como solanáceas (Satish *et al.*, 1999), o con efectos antivirales, como en *Clorophytum nepalense*, de la cual se obtuvieron extractos de las raíces y fueron aplicados en el control de lesiones necróticas de cultivos de papas (Acharya, 2013).

2.6 Rutas de metabolitos secundarios

Los terpenos o terpenoides, se sintetizan a través de dos rutas: 1) la del ácido mevalónico, que se activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico, que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien, 2) la ruta del metil eritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. El isopentenil bifosfato y su isómero dimetil alil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas, para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranil geranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos. Se conocen unos 25 000 terpenoides (Ávalos y Pérez, 2009).

Los alcaloides se sintetizan principalmente a partir de aminoácidos. Se obtienen normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina. Aproximadamente se conocen 12 000 compuestos (Leyva *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos o fenilpropanoides se derivan de dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: 1) la ruta del ácido shikímico, donde a partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenol pirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikímico y derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y 2) la ruta del ácido malónico. Se reportan más de 8 000 moléculas (Leyva *et al.*, 2011).

Los glicósidos hacen referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos. Se han calculado 5 000 estructuras químicas (Ávalos y Pérez, 2009).

2.7 Efecto de los hongos micorrízicos y nutrientes en la concentración de metabolitos secundarios.

Es conocido que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) pueden inducir cambios en el metabolismo secundario (Yuan *et al.*, 2007; Sbrana *et al.*, 2014). En este sentido, se ha encontrado que la simbiosis de los HMA en las plantas en algunas ocasiones han propiciado una mejora en la producción y acumulación de importantes ingredientes activos (Oliveira *et al.*, 2014), tales como terpenos (aceites esenciales totales, sesquiterpenos, diterpenos); fenoles (cumarina o flavonoides) y alcaloides (camptotecina, escopolamina, berberina) (Zeng *et al.*, 2013), dentro de los cuales, los HMA pueden mejorar la biosíntesis de metabolitos benéficos para la salud (Oliveira *et al.*, 2014), como carotenoides, flavonoides, fitoestrógenos, y enzimas (Sbrana *et al.*, 2014). Sin embargo, en una evaluación en la planta *Catharanthus roseus*, De la Rosa (2009) evaluó el efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y estrés abiótico inducido por la aplicación de cloruro de sodio y/o dosis de bicarbonato de potasio en el crecimiento y contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina), encontrando que plantas micorrizadas presentaron menor contenido de compuestos fenólicos a diferencia de las no micorrizadas, pero cuando se adicionó KHCO_3 para estresar a las plantas, presentaron un incremento hasta del 79% en los compuestos fenólicos a diferencia de las que no se estresaron, ni se inocularon con HMA.

En una revisión donde se reportan 26 trabajos relacionados con el uso de HMA para mejorar la calidad de los metabolitos secundarios, así como, para mejorar la materia de las plantas medicinales, se encontró que el contenido de flavonoides fueron significativamente más altos cuando se asociaron con HMA en las plantas *Bupleurum chinense*, *Salvia miltiorrhiza* Bge, *Ginkgo biloba* L., *Astragalus membranaceus* y *Scutellaria baicalensis* Georgi (Zeng *et al.*, 2013). Mientras que en otros trabajos, han sido otros los metabolitos que se han incrementado como en Orujeia *et al.* (2013), quien probó el efecto de dos especies

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

de HMA en el incremento de compuestos fenólicos y glicirricina, derivados del metabolismo secundarios, en regaliz (*Glycyrrhiza glabra* L). Los HMA incrementaron estos metabolitos secundarios en tiempos diferentes, debido a que, el incremento de fenoles con *G. mosseae* fue a los 3 meses, mientras que con *R. intraradices* el incremento fue a los 6 meses. Baslam et al. (2013) en un trabajo con HMA asociados a lechugas cultivadas en invernadero, encontró que las cantidades de neoxantinas, luteína y β -caroteno (metabolitos importantes en la alimentación como vitamínicos) en las hojas, fueron significativamente mayores en las plantas micorrizadas que en las plantas no micorrizadas, independientemente de las especies de HMA inoculados. Un estudio con *Anadenanthera colubrina* reveló que el uso de HMA influyó en la producción de los metabolitos secundarios en las hojas, donde se maximizaron los compuestos fenólicos y taninos (Pedone et al., 2012). *Echinacea purpurea* (L.) Moench, importante especie medicinal, contiene compuestos fenólicos y alcanidas con propiedades antipatógenas, la cual fue inoculada con HMA *Rhizophagus intraradices*, mostrando que el HMA tuvo efecto en el incremento de compuestos fenólicos, aunque no de las alcanidas contenidos en esta especie (Araim et al., 2009). *Gloriosa superba* es otra de las plantas medicinales con gran demanda, debido a la colchicina, un alcaloide muy utilizado como medicamento, por lo cual, en la búsqueda del incremento de este compuesto se inoculó con el HMA de la especie *Acaulospora laevi* y una mezcla de HMA, con los cuales *G. superba* presentó un incremento en colchicina a diferencia de los tratamientos en los que no se inocularon (Yadab et al., 2013).

El efecto de los HMA en la modificación de metabolitos secundarios puede variar en tiempos, como lo demostró Farfán (2010), quién evaluó los efectos de HMA en el contenido de compuestos volátiles de nurite [*Satureja macrostema* (Benth) Briq], en periodos de 30, 60 y 90 días. Los metabolitos secundarios contenidos en la planta, principalmente, fueron compuestos terpenoides, de los cuales, pulegona y timol se incrementaron a los 30 días de haberse establecido el

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

experimento, mientras el incremento de canfeno y β -mirceno fue los 60 días y escualeno a los 90 días. En estos compuestos se presentó un incremento casi del doble con respecto a las plantas que no se micorrizaron.

2.8 Axihuitl.

El axihuitl (*Eupatorium aschermbornianum* Sch.) pertenece a la familia *Asteraceae* (*Compositae*), es una planta silvestre, también conocida como hierba de agua. Morfológicamente, tiene abundantes hojas con forma de corazón, con onditas alrededor de la hoja y contiene una especie de filamentos, es de tallo grueso y áspero al tocarlo, con manchas pequeñas en todo su alrededor y se da en varas grandes (Figura 2). Se le puede encontrar fácilmente en la época de lluvias y su periodo de floración ocurre entre los meses de noviembre a febrero en Tepoztlán Morelos México (Godínez, 2012).



Figura 2. Aspecto general de plantas de axihuitl creciendo en su estado natural en Tepoztlán Morelos México (Fotografías G. Rincón-Enríquez).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

El axihuitl es utilizado en el municipio de Tepoztlán, Morelos, conocida por la mayoría de sus habitantes, debido a que abunda en gran parte de los poblados y se utiliza como planta curativa para la cicatrización de heridas, problemas gastrointestinales como úlceras y para aliviar problemas musculares. Se emplea con otras plantas para preparar una bebida estimulante llamada pahtlapozon o curalotodo. Se le puede adquirir fácilmente en el municipio de Tepoztlán, debido a que su producción es abundante en la temporada de lluvias (Godínez, 2012).

Los componentes químicos que se han reportado del género *Eupatorium* suman unos 149, los cuales incluyen derivados de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, alcaloides, aceites esenciales y otros pero los compuestos sesquiterpénicos son los componentes predominantes dentro de este género (Glasby, 2002).

Sánchez et al. (2009) realizó un estudio de *E. aschembornianum* de la actividad gastroprotectora que tiene esta planta, donde utilizó un modelo de lesiones gástricas inducidas por metanol en ratas wistar. Obtuvo un extracto hexánico de *E. aschembornianum* y su efectividad gastroprotectora fue eficaz en una dosis de 100 mg kg⁻¹.

Prado (2012) evaluó la efectividad biológica *in vitro* de *Eupatorium aschembornianum* Sch., como agente inhibitorio de *Erwinia chrysanthemi*, agente causal de la pudrición blanda en plantas, utilizando tres tipos de solventes (hexano, metanol y etanol) para la obtención del extracto de *E. aschembornianum*, encontrando que el extracto obtenido con metanol tuvo mayor efectividad biológica (bactericida) sobre *E. chrysanthemi*. Así mismo, Godínez (2012) evaluó la efectividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de *E. aschembornianum* sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* cepa 1448A, obteniendo que *E. aschembornianum* posee compuestos con actividad antibacteriana específicamente bactericida. De igual forma se evaluaron los aceites esenciales de *E. aschembornianum*, los cuales mostraron perder actividad biológica durante

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

su conservación en el tiempo, debido a que su efecto antibacteriano se degradaba con rapidez, pues a las dos semanas de obtener los aceites, estos ya no presentaron inhibición parcial en las pruebas microbiológicas y a los dos meses perdió por completo su efecto bactericida.

2.9 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Es un microorganismo unicelular (procarionte), cuyo material genético (ADN) no está contenido por una membrana. Pertenece a las bacterias Gram-negativas (Agrios, 2005). Su taxonomía se describe a continuación:

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Pseudomonas*

Especie: *P. syringae*

P. syringae pv. *phaseolicola* provoca una de las enfermedades más comunes en el frijol conocida como “tizón de halo”, llegando a ocasionar grandes pérdidas en los campos de cultivos, debido a que afecta hojas y vainas. Se han reportado pérdidas en rendimiento del 23 hasta el 43% en algunos lugares de Estados Unidos de América (Mena *et al.*, 2010) y tiene una amplia dispersión geográfica, de hecho se encuentra en todas las regiones en que se cultiva comercialmente el frijol (González *et al.*, 2002).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

El crecimiento óptimo de la bacteria es a 28°C. Produce una toxina denominada faseolotoxina que induce clorosis y actúa como inhibidor reversible de la enzima ornitina carbamoiltransferasa, la cual cataliza la conversión de ornitina a citrulina en la biosíntesis de arginina. La producción de la faseolotoxina es producida óptimamente entre los 18 a 20°C (Arvizu *et al.*, 2013).

Pseudomonas syringae secreta una toxina vegetal conocida como lipodepsinonapéptido siringomicina, la cual afecta el transporte de iones, a través de las células, como ejemplo, afecta el rápido flujo del ion K⁺, así mismo, influye en la apertura y cierre de los estomas, volviendo más lento este proceso (Mott y Takemoto, 1989). La apariencia de esta bacteria es amarillo fluorescente al ser cultivada *in vitro*, en medio King B (KB), produciendo pioverdina siderofora (Cody y Gross, 1987). En el tizón del halo la bacteria puede afectar hojas, tallo, vainas y semillas. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen como pequeñas manchas acuosas y angulares, frecuentemente rodeadas por un halo pálido amarillento en las hojas, de donde la enfermedad toma su nombre. En climas secos, estas manchas toman una coloración bronceada y mueren. En las semillas puede no encontrarse síntomas o mostrar áreas con cambios en la coloración de las testas, sólo visibles en las variedades de semillas blancas o de color claro y también pueden presentar rugosidades o estar encogidas. Los síntomas consisten en achaparramiento, marchitez reversible, clorosis, mosaico foliar y malformación de las hojas (Prudencio *et al.*, 2008).

III JUSTIFICACIÓN

Las plagas y enfermedades que atacan cultivos de interés comercial, pueden causar pérdidas importantes (Rincón y Quiñones, 2010) que pueden ser entre 15-30% del total de los cultivos, tan solo, causadas por enfermedades fúngicas (Rogozhina *et al.*, 2011). Actualmente el principal método para proteger las plantas contra patógenos ha sido el implemento de tratamientos con pesticidas químicos, que afectan tanto a organismos patógenos, como a la microbiota benéfica, además, en diversos estudios se ha demostrado que estos compuestos han causado resistencia en estos patógenos, así mismo, representan un riesgo potencial para la seguridad del medio ambiente y la salud humana (Vindas *et al.*, 2004). Como alternativa, las plantas contienen muchos compuestos provenientes del metabolismo secundario con propiedades antimicrobianas que permiten el control de patógenos y plagas (Rogozhina *et al.*, 2011).

Hasta el momento, la investigación realizada con la planta medicinal *Eupatorium aschembornianum* ha sido enfocada, sobre todo, a su potencial como fuente de compuestos con alguna aplicación médica, por ejemplo, su acción gastroprotectora (Sánchez *et al.*, 2009). Recientemente, se descubrió que también posee propiedades bactericidas contra algunos fitopatógenos (Godínez, 2012), sin embargo es necesario seguir investigando el potencial bactericida de esta especie con el fin de usarlo como precursor de bioinsumos de valor agregado para la agricultura orgánica (Rincón y Quiñones, 2010). Por otro lado, el incremento de productos de metabolitos secundarios en plantas medicinales es de gran importancia en el cultivo industrial de plantas medicinales (Radhika y Rodrigues, 2011). Algunos de los métodos para incrementar la concentración de metabolitos secundarios son el cultivo de plantas *in vitro*, inhibición de la degradación de los

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

productos mediante el descenso en el catabolismo; mediante la transgénesis de genes de plantas en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*; manipulación de algunos componentes del medio de cultivo como carbono, fosfato, nitrógeno y microelementos; aplicación de fitohormonas y aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (Arias *et al.*, 2009; Farfán, 2010; Pérez y Jiménez, 2011; Yadab *et al.*, 2013). En este trabajo, se evaluó el efecto sobre la concentración de compuestos con efecto bactericida del axihuitl, mediante el implemento de diferentes consorcios con hongos micorrízicos arbusculares en combinación con diferentes niveles y fuentes de materia orgánica.

IV HIPÓTESIS

La inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y adición de materia orgánica, promueven el crecimiento vegetal y la concentración de compuestos bioactivos con efecto bactericida en el axihuitl.

V OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto de distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares y materia orgánica en el crecimiento vegetal de *Eupatorium aschembornianum* y en la concentración de compuestos bioactivos con efecto bactericida.

5.2 Específicos

Evaluar el efecto de distintos consorcios micorrízicos arbusculares y diferentes fuentes y niveles de materia orgánica sobre el crecimiento vegetal de las plantas de axihuitl.

Evaluar el efecto de distintos inóculos de consorcios micorrízicos arbusculares y diferentes fuentes y niveles de materia orgánica en la concentración de compuestos bioactivos con efecto bactericida del extracto del axihuitl.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

Por ser el axihuitl una especie silvestre, de la cual no se conoce su hábito de crecimiento bajo condiciones controladas de invernadero, se generaron diversos protocolos para la germinación de semilla, así como de condiciones de crecimiento en el invernadero. Una vez estandarizada la germinación de semillas y condiciones de crecimiento de las plantas, se realizaron tres experimentos, en los cuales se evaluaron diferentes niveles de materia orgánica adicionada al sustrato y diferentes inóculos de hongos micorrízicos arbusculares sobre el crecimiento y concentración de compuestos bioactivos del axihuitl.

6.1 Germinación de la semilla.

Las semillas (Figura 3) fueron colectadas en Tepoztlán, Morelos se separaron de restos vegetales y se limpiaron. Se colocaron en charolas de aluminio de 10 cm² y una profundidad de 2.5 cm, con arena estéril (120°C en un autoclave PRESTO Steele, durante 45 minutos), mezclada con vermiculita al 5% (v/v). Se hicieron pequeños surcos paralelos y fueron colocadas las semillas a lo largo de cada surco, posteriormente se taparon con un poco de sustrato. Se observó que cuando hubo un aumento en la germinación de las semillas de axihuitl (a los 6 días de sembrarse), coincidió con la presencia de lluvias, por lo cual se consideró que las semillas incrementaron la velocidad de germinación, probablemente por el aumento de la humedad relativa en el ambiente. Las plántulas presentaron las primeras dos hojas verdaderas en un promedio de 2 meses, a partir de la siembra.



Figura 3. Semilla de axihuitl observada en microscopio estereoscópico (10x).

6.2 Material biológico.

6.2.1 *Eupatorium aschembornianum* (axihuitl): las plantas de axihuitl empleadas en los experimentos se obtuvieron a partir de semillas germinadas en el laboratorio (Figura 4), las cuales tenían las primeras dos hojas verdaderas y una altura promedio de 2 cm.



Figura 4. Plántulas de axihuitl con sustrato arena-vermicomposta 5%

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axíhuítl 2015

6.2.2 *Inóculos HMA*: se utilizó un inóculo mono-específico comercial compuesto de hongos micorrízicos arbusculares de la especie *Rhizophagus intraradices* (micorriza INIFAP), así como distintos consorcios micorrízicos provenientes de localidades de los estados de Morelos y Michoacán (Cuadro 2) y propagados en CIATEJ e IIAF.

Cuadro 2. Inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) propagados en macetas trampa y empleados en los experimentos de este estudio.

Consortio de HMA	Procedencia	Especies de HMA
Copalcohuítl	San Juan Tlacotenco, Morelos	No identificadas
Antiguas vías del tren	San Juan Tlacotenco, Morelos	No identificadas
Tezontitla	San Juan Tlacotenco, Morelos	No identificadas
Cerro del Metate	Tzitzio Michoacán	<i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Glomus aff. Glomerulatum</i> , <i>Diversispora aurantium</i> , <i>Funneliformis geosporum</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Glomus microaggregatum</i> , <i>Glomus aff. Glomerulatum</i> .
El Limón	Tumbisca Morelia, Michoacán	<i>Archaeospora schenckii</i> , <i>Acaulospora mellea</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Glomus desertícola</i> .
Las Campesinas	Etúcuaro Madero, Michoacán	<i>Archaeospora schenckii</i> , <i>Acaulospora scrobiculata</i> , <i>Entrophospora infrequens</i> , <i>Glomus desertícola</i> , <i>Septoglomus viscosum</i>

Las especies aquí mencionadas fueron reportadas por Trinidad (2014).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

6.2.3 *Fitopatógeno*: Se utilizó la cepa 1448A^a de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, la cual fue proporcionada de la colección bacteriana del laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIATEJ, para evaluar la efectividad bactericida de los extractos de axihuitl mediante pruebas microbiológicas.

6.3 Sustratos

En los experimentos se utilizó arena estéril como soporte de crecimiento de las plantas. En el primero y segundo experimento la arena provino de un banco cercano a la localidad de Zinapécuaro, Michoacán y en el tercer experimento se utilizó arena de río proveniente de Guadalajara, Jalisco.

A la arena se le adicionaron tres tipos de materia orgánica previamente esterilizada. Para el primer experimento se adicionó vermicomposta comercial, para el segundo experimento composta a base de cachaza de caña (se presenta la descripción de estas dos fuentes de materia orgánica en anexo 13.2 y 13.3. Para el tercer experimento se adicionó cachaza de caña y suelo proveniente de zonas de colecta de las semillas de axihuitl en Morelos.

6.4 Trasplante e inoculación.

Las plántulas de axihuitl se trasplantaron en bolsas negras para vivero con capacidad para un kg, adicionando primero la arena con el nivel de materia orgánica (MO) de acuerdo al tratamiento correspondiente. Se regaron hasta saturar la maceta. Posteriormente se hizo un orificio en el sustrato con una espátula, de manera que cupiera la raíz. Se colocó una plántula por maceta, al mismo tiempo que se adicionó el inóculo correspondiente de HMA (80 esporas) en la raíz según el tratamiento, de manera que quedara en contacto directo con la raíz. Finalmente se cubrieron con el sustrato.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF). Se proporcionó un riego a saturación cada dos días, con agua desionizada.

6.5 Diseño experimental.

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes, los cuales tuvieron un mismo diseño experimental factorial, donde se evaluó el factor materia orgánica y el factor inóculo de HMA, realizado en un acomodo completamente al azar, en condiciones de invernadero.

6.6 Primer experimento: Efecto de la materia orgánica y *Rhizophagus intraradices* en el crecimiento de las plantas y efectividad bactericida de los extractos de axihuitl sobre *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

Puesto que se desconocen los requerimientos de materia orgánica del axihuitl, para verificar si esta planta se llegaba a micorrizar, se estableció un diseño con dos niveles de materia orgánica: con una vermicomposta comercial (Vermizula) y un inóculo comercial monoespecífico, compuesto de hongos micorrízicos arbusculares de la especie *Rhizophagus intraradices* constando de cuatro tratamientos, repetidos cuatro veces, obteniendo un total de 16 unidades experimentales, UE (Cuadro 3).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Cuadro 3. Tratamientos para evaluar el efecto de HMA y materia orgánica en el crecimiento de axihuitl.

Inóculo / MO	Clave de tratamiento
<i>Rhizophagus intraradices</i> (RI) / vermicomposta (porcentaje de MO)	T1: Sin RI / ver 0%
	T2: Sin RI / ver 5%
	T3: Con RI / ver 0%
	T4: Con RI / ver 5%

4 tratamientos x 4 repeticiones = 16 UE. RI (*Rhizophagus intraradices*), MO (materia orgánica), Ver (vermicomposta).

6.7 Segundo experimento: Efecto de diferentes niveles de materia orgánica y distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento de las plantas y efectividad bactericida de los extractos de axihuitl sobre *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

Se evaluaron tres consorcios de HMA nativos de suelo rizosférico de agave del Estado de Michoacán, un consorcio nativo de suelo rizosférico donde crece el axihuitl del Estado de Morelos y un inóculo monoespecífico comercial con HMA *Rhizophagus intraradices* y un testigo sin HMA; tres niveles de materia orgánica al 0, 2.5 y 5%, los cuales formaron 18 tratamientos. Los consorcios de HMA nativos de Michoacán, fueron utilizados debido a que en plantas de leucaena (*Leucaena leucocephala*), guayaba (*Psidium guajava*), agave (*Agave cupreata* Trel & Berger) y chile (*Capsicum annuum* L.) se obtuvieron incrementos en el crecimiento vegetal (Reyes, 2012; Torres, 2014; Reyes, 2015). Se colocaron seis repeticiones por tratamiento, obteniendo un total de 108 unidades experimentales (Cuadro 4). El experimento se mantuvo en condiciones de invernadero durante 6 meses.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Cuadro 4. Diseño de tratamientos de inóculos de HMA de Michoacán, Morelos y comercial a distintos niveles de materia orgánica en plantas de axihuitl.

Inóculo de HMA / MO	Tratamiento: Clave
<i>Rhizophagus intraradices</i> / composta	T1: RI com 5%
	T2: RI com 2.5%
	T3: RI com 0%
Cerro del Metate / composta	T4: CM com 5%
	T5: CM com 2.5%
	T6: CM com 0%
El Limón / composta	T7: L com 5%
	T8: L com 2.5%
	T9: L com 0%
Las Campesinas /composta	T10: Ca com 5%
	T11: Ca com 2.5%
	T12: Ca com 0%
Copalcohuitl / composta	T13: Co com 5%
	T14: Co com 2.5%
	T15: Co com 0%
Sin Hongos micorrízicos arbusculares / composta	T16: Sin HMA/com 5%
	T17: Sin HMA/com 2.5%
	T18: Sin HMA/com 0%

18 tratamientos x 6 repeticiones = 108 UE. Com (composta), MO (materia orgánica), RI (*Rhizophagus intraradices*), CM (Cerro del Metate), L (El Limón), Ca (Las Campesinas), Co (Copalcohuitl), HMA (hongos micorrízicos arbusculares).

6.8 Tercer experimento: Evaluación del efecto de seis inóculos de HMA, dos fuentes de materia orgánica y dos niveles de materia orgánica en el crecimiento y la concentración de sustancias bioactivas del axihuitl.

Se evaluaron dos consorcios nativos del estado de Michoacán, tres consorcios nativos del Estado de Morelos, un inóculo comercial con HMA *Rhizophagus intraradices* y un control sin HMA; dos fuentes de materia orgánica (composta a base de cachaza de caña 5%, v/v y suelo de parcelas de cultivo del axihuitl de Morelos 5%, v/v). De estos factores se generaron 21 tratamientos con 10

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

repeticiones, siendo un total de 210 unidades experimentales (Cuadro 5). El experimento se mantuvo en invernadero durante cuatro meses.

Cuadro 5. Diseños de tratamientos de micorrización y materia orgánica con plantas de axihuitl bajo condiciones de invernadero.

Inóculo de HMA / MO	Tratamiento: Clave
<i>Rhizophagus intraradices</i> / composta / suelo de Morelos	T1: RI com 5% T2: RI SM 5% T3: RI MO 0%
Las Campesinas / composta /suelo de Morelos	T4: Ca com 5% T5: Ca SM 5% T6: Ca MO 0%
Cerro del Metate / composta / suelo de Morelos	T7: CM com 5% T8: CM SM 5% T9: CM MO 0%
Copalcohuítl / composta / suelo de Morelos	T10: CO com 5% T11: CO SM 5% T12: CO MO 0%
Antiguas vías del tren / composta /suelo de Morelos	T13: AV com 5% T14: AV SM 5% T15: AV MO 0%
Tezontitla / composta / suelo de Morelos	T16: Te com 5% T17: Te SM 5% T18: Te MO 0%
Sin Hongos micorrízicos arbusculares /composta / suelo de Morelos	T19: Sin HMA/Com 5% T20: Sin HMA/SM 5% T21: Sin HMA/MO 0%

21 tratamientos x 10 repeticiones= 210 UE. Com (composta), SM (suelo de Morelos), MO (materia orgánica), RI (*Rhizophagus intraradices*), Ca (Las Campesinas), CM (Cerro del Metate), L (El Limón), Co (Copalcohuítl), AV (Antiguas vías del tren), Te (Tezontitla), HMA (hongos micorrízicos arbusculares).

6.9 Manejo de los experimentos.

Las macetas se colocaron bajo malla sombra con apertura 80-20, la cual permite el paso del 20% de luz. Se les proporcionó un riego cada dos días con agua desionizada.

6.10 Variables de crecimiento vegetal evaluadas en los experimentos.

Se evaluaron diversas variables de crecimiento cada mes a partir de la inoculación de las plantas. En el primer y segundo experimento se midieron por un periodo de 180 días, mientras que en el tercer experimento se midieron por un periodo de 120 días.

6.10.1 Altura de la planta.

Se midió de forma manual con regla graduada en centímetros, pero las unidades se reportaron en milímetros. La medición se realizó a partir de la base del tallo, hasta el ápice (apertura de la última hoja).

6.10.2 Diámetro del tallo.

Se midió a partir de 1 cm de la base del tallo, con vernier digital graduado en milímetros.

6.10.3 Número de hojas.

Se contó el número de hojas de manera visual, considerando solo hojas frescas, incluyendo tanto hojas grandes como pequeñas.

Al final de los experimentos, se llevó a cabo la destrucción de las plantas, consistiendo en la separación de las diferentes partes, como son las hojas, el tallo y la raíz y se midieron las siguientes variables de crecimiento:

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

6.10.4 Longitud de raíz.

Se midió la longitud con regla en milímetros, desde el inicio de la raíz hasta la punta de la misma.

6.10.5 Volumen de raíz.

El volumen se midió mediante el desplazamiento de agua en una probeta de plástico graduada de 100 mL, introduciendo la raíz en un volumen de agua conocido.

6.10.6 Área foliar.

Las hojas de las plantas ya separadas de tallo se colocaron de manera extendida en un planímetro LICOR, modelo LI-3100, medidas en cm².

6.10.7 Pesos frescos.

Cada parte de la planta se pesó en balanza digital marca Mettler Toledo, modelo PR 8002, en g.

6.10.8 Pesos secos.

De acuerdo a Godínez (2012), las plantas se dejaron secar a temperatura ambiente en un lugar desprovisto de humedad y hasta total sequedad. Y se pesaron en balanza digital en g.

6.11 Variables microbiológicas.

Para observar si las raíces se micorrizaron y obtener el porcentaje de colonización, se tomó una porción de la raíz fresca, se lavó, se fijó en formol ácido acético y alcohol (FAA) y posteriormente se tiñeron.

6.11.1 Tinción de raíces.

Mediante la técnica de Phillips y Hayman (1970), con ligeras modificaciones, se colocaron las raíces conservadas en FAA en celdas de tinción. Las raíces se colocaron en celdas para tejido para aclararse, se sumergieron en KOH al 10%. El hidróxido de potasio se calentó hasta ebullición, en este momento se sumergieron las celdas con las raíces hasta que se cubrieron completamente y se dejaron en estas condiciones durante 2.5 minutos. Posteriormente se enjuagaron y se colocaron en azul de tripano al 0.05% en ebullición durante 2.5 minutos. Finalmente se colocaron las celdas en frascos de cristal con lactoglicerol para su conservación.

6.11.2 Porcentaje de colonización micorrízica (PCM).

Se cortaron 30 trozos de raíz de 1 cm de largo de cada tratamiento en un portaobjetos, distribuidos en tres columnas con 10 filas (3 repeticiones por tratamiento), colocando una gota de lactoglicerol y cubre objetos. Se observaron estructuras (vesículas, hifas y arbusculos o esporas) con el microscopio compuesto y se obtuvo el PCM por el método de estimación de McGonigle et al. (1990) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CM} = \frac{(\text{TCO} - \text{CNoC})}{\text{TCO}} \times 100$$

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Dónde:

% CM= porcentaje de colonización micorrízica.

TCO= total de campos observados.

CNoC= número de campos observados no colonizados por estructuras fúngicas.

6.12 Obtención de extractos acetónicos de axihuitl.

Se utilizaron el tallo y las hojas del axihuitl completamente secas, protegidas de la luz solar en el laboratorio a temperatura ambiente. La parte aérea se fraccionó en trozos más pequeños y se molió en un molino eléctrico marca KRUPS, modelo GX 4100, durante 1 minuto (Figura 5).



Figura 5. Molienda de tejido seco de plantas de axihuitl en un molino eléctrico.

El axihuitl molido se colocó en un frasco de cristal con acetona al 100%, en una proporción 1:4 (1 g de extracto por 4 mL de acetona) cubierto con papel aluminio para proteger el extracto de la luz y se dejó macerando por dos semanas, en un agitador multipropósito marca Scientific, modelo CVP 2000 P en agitación constante y cubierto con papel aluminio para proteger el extracto de la luz.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Transcurrido el tiempo de maceración, se retiraron los restos de materia vegetal al solvente mediante filtración al vacío, con un equipo de filtración (Figura 6), compuesto por embudo buchner y matraz kitasato, los cuales estaban conectados a una bomba de vacío, donde se recuperó el extracto en el matraz y los restos de materia vegetal fueron retirados durante la filtración (Prado, 2012).



Figura 6. Filtración y rotaevaporación de los residuos acetónicos del extracto crudo de axihuitl.

Finalmente se dejó evaporar el solvente en campana de extracción hasta que quedó solo el extracto, el cual tuvo una coloración verde, con una consistencia espesa (Figura 7) y se le agregó diclorometano al extracto de axihuitl para conservarlo en refrigeración a 4°C hasta su empleo.



Figura 7. Aspecto general del extracto acetónico de plantas de axihuitl.

6.13 Pruebas de efectividad biológica: actividad bactericida.

Para cuantificar la actividad biológica bactericida del axihuitl, se realizaron pruebas *in vitro*, mediante difusión en agar con medio sólido KB (consistente en la mezcla de K₂HPO (1 M), MgSO₄ (1 M), peptona, glicerol y agar para medio sólido y sin agar para medio líquido), de acuerdo a lo propuesto por Prado (2012) y Godínez (2012). En las cajas Petri con este medio de cultivo se sembró la cepa 1448A^a de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, junto con los extractos correspondientes a los tratamientos establecidos en el experimento. Como control negativo, se utilizó cloranfenicol como antibiótico y para el control positivo se utilizó solo medio KB sin antibiótico. Por cada tratamiento se realizaron tres repeticiones.

6.13.1 Reactivación de Pseudomonas syringae pv. phaseolicola.

P. syringae pv. *phaseolicola* se transfirió de un cultivo en caja Petri con asa microbiológica a un matraz con medio KB líquido. El matraz se dejó en agitación durante 24 horas a una temperatura de 28°C.

6.13.2 Crecimiento de Pseudomonas syringae pv. phaseolicola y aplicación con el extracto in vitro.

Del matraz en agitación se tomaron 2 mL con micropipeta para reinocular a otro matraz con medio KB líquido. Después se midió en espectrofotómetro la concentración aproximada de la bacteria a una densidad óptica (DO) de 600= 0.1 nm. Se tomó una lectura cada hora. Cuando esta llegó a una absorbancia de 0.6 nm (fase exponencial), se tomó el cultivo bacteriano para las pruebas de inhibición de su crecimiento (actividad bactericida).

Mediante curvas de crecimiento bacteriano se obtuvo un mismo número de células para la evaluación de la actividad antimicrobiana. Para ello se utilizó una densidad óptica inicial (DO) de 600 nm, a una absorbancia de 0.1, llevando la bacteria hasta una absorbancia de 0.6, debido a que en este punto *P. syringae* pv. *phaseolicola* se encuentra en fase de crecimiento logarítmica (Godínez, 2012). Cuando la bacteria alcanzó esta fase, se colocaron 2 mL de la suspensión bacteriana en medio KB líquido en microtubos (Eppendorf). Los tubos se centrifugaron a 10 000 rpm, durante 10 min. El sobrenadante se retiró para dejar únicamente la pastilla en el tubo. Se aplicaron 20 µL de cloranfenicol (50 µg mL⁻¹) al control negativo; se aforó a 2 mL de medio líquido KB para el control positivo y los extractos de los diferentes tratamientos se colocaron a concentraciones de 40, 60 y 80 mg mL⁻¹ en un volumen final de 2 mL de cultivo (el volumen faltante se ajustó con medio líquido KB). Se agitaron los tubos en vórtex y se vaciaron a tubos plásticos de 50 mL. Se dejaron en agitación constante durante 24 h a una temperatura de 28°C. Posteriormente estos medios de cultivos se sembraron 100 µL de cada repetición por tratamiento en placas con medio KB sólido. Se incubaron por 24 a 72 horas para observar los resultados, por medio del cambio en la apariencia del medio sólido KB, el cual se torna amarillo fluorescente cuando se encuentra presente el compuesto llamado piorverdina siderofora, producido por la *P. syringea* pv. *phaseolicola*, mientras que en las placas que no presentaron este cambio de coloración fue el indicativo de que el extracto incrementó el compuesto bioactivo con efecto bactericida.

6.14 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurión XV, con el cual se realizó el análisis de varianza para las distintas variables cuantitativas de los tres experimentos realizados en este trabajo de tesis. En los casos donde el ANOVA resultó significativo, se realizó una prueba de Tukey con nivel de confianza de 95%. También se realizaron análisis de correlación entre las variables de crecimiento, la colonización micorrízica y la inhibición bacteriana.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto de la materia orgánica y *Rhizophagus intraradices* en el crecimiento de las plantas y efectividad bactericida de los extractos de axihuitl sobre *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

7.1.1 Dinámica del crecimiento vegetal del axihuitl bajo condiciones de invernadero.

Durante los 180 días que permanecieron las plantas de axihuitl en condiciones de invernadero, los tratamientos con *Rhizophagus intraradices* sin vermicomposta (T3) y sin *R. intraradices* sin vermicomposta (T1), sobrevivieron hasta los 60 y 90 días, respectivamente (Figura 8). Como no fue posible evaluar estos dos tratamientos al final del experimento, no se presentaron datos después de transcurrido este tiempo.



Figura 8. Efecto de la materia orgánica sobre el crecimiento de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 80 días después de establecido el experimento.

Los tratamientos a los que se adicionó vermicomposta (T2 y T4) sobrevivieron hasta el final del experimento. Los dos tratamientos con vermicomposta, uno con y otro sin *R. intraradices*, no presentaron diferencias estadísticamente significativas, tanto en la variable de crecimiento de altura de la planta, T2 = 310.12 mm y T4= 280.12 mm (Figura 9), como en el diámetro del tallo, T2 = 7.0 mm y T4= 6.5 mm (Figura 10). La similitud estadística en cuanto a estas variables de crecimiento pudo deberse, en parte, a que el tiempo de permanencia de los tratamientos que estuvieron inoculados con *R. intraradices*, no fue suficiente para que se observará el efecto de los HMA, puesto que en otros estudios, este efecto se ha observado después de los seis meses de inoculación, donde se ha presentado hasta un 85% de colonización de HMA en una planta de la familia Asteraceae, *Inula ensifolia* L. (Zubek *et al.*, 2010), mientras que en este experimento se presentó un 26% de colonización de HMA. Los hongos micorrízicos toleraron el nivel de materia orgánica (5%, v/v) aplicado a los tratamientos, sin embargo, también pudo ser un nivel elevado para que ellos incrementaran sus estructuras fúngicas, manifestándose en la disminución de la colonización del HMA en la planta, lo cual se ha observado cuando se aumenta la fertilidad en el sustrato (Herrera *et al.*, 2011). Siddiqui *et al.* (2008) mencionan que las interacciones entre los HMA y la fertilización son complejas y difíciles de predecir, mientras que en algunos casos donde se ha aplicado abono orgánico, ha conducido a un aumento en la colonización, en otros donde no se añadió fertilización de ningún tipo se ha encontrado mayor colonización.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

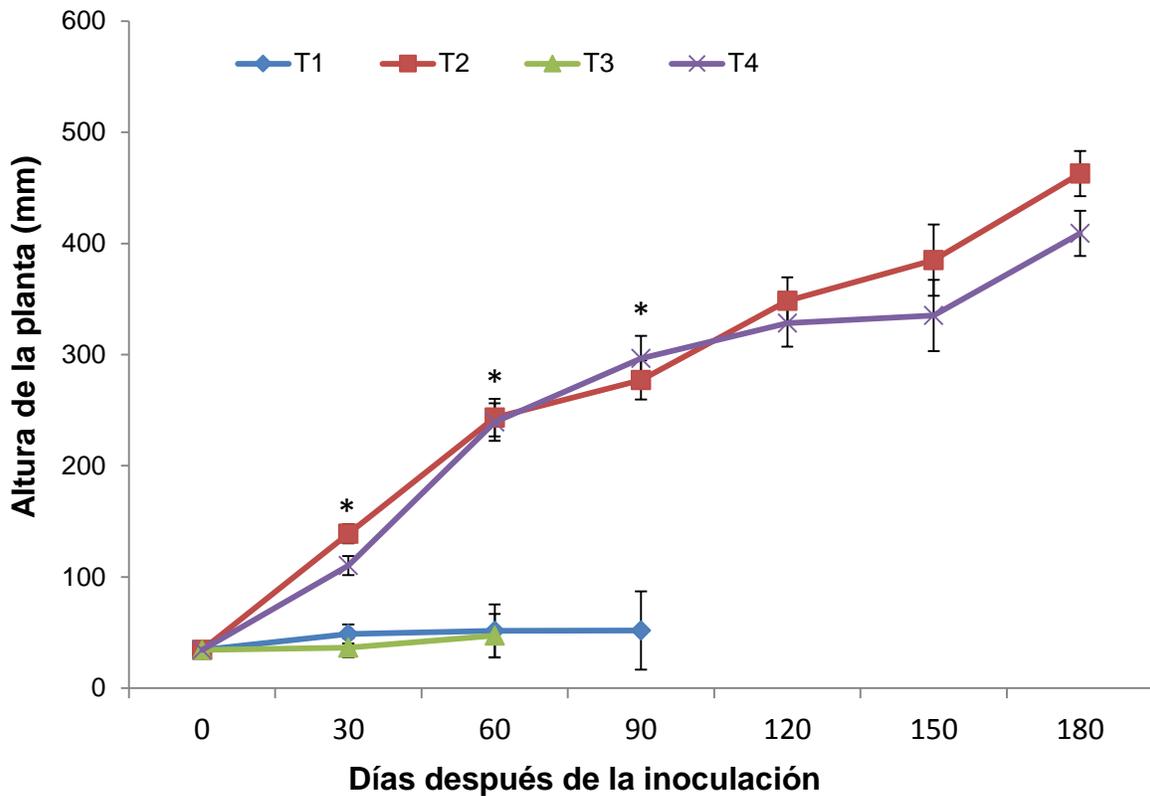


Figura 9. Efecto de HMA y vermicomposta sobre la altura de planta de axihuitl bajo condiciones de invernadero. T1 sin RI ver 0%; T2 sin RI ver 5%; T3 con RI ver 0% y T4 con RI ver 5%. Diferencias obtenidas mediante prueba de Student. Las barras en cada punto representan \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre tratamientos a esta fecha.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

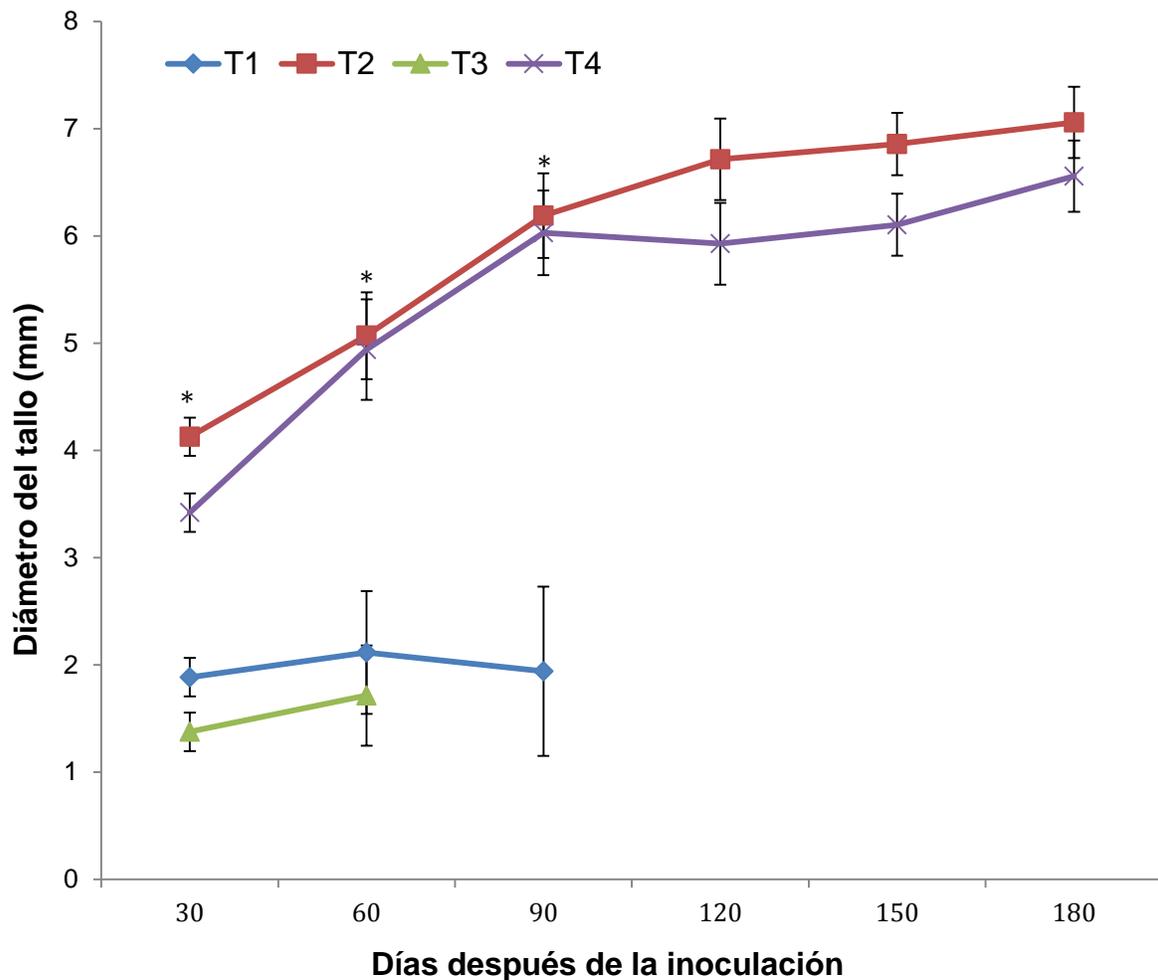


Figura 10. Efecto de HMA y vermicomposta en el diámetro del tallo del axihuitl bajo condiciones de invernadero. T1 sin RI ver 0%; T2 sin RI ver 5%; con RI ver 0% y T4 con RI ver 5%. Diferencias obtenidas mediante prueba de Student. Las barras en cada punto representan \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre tratamientos a esta fecha.

En cuanto a las plantas de los tratamientos a los que no se les adicionaron ninguna fuente de nutrientes y que murieron entre los 60 y 80 días, pudiera deberse al hecho de que el axihuitl no toleró estas condiciones, ya que esta especie crece en zonas que contienen mucha materia orgánica (Contreras *et al.*,

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

2006). Por otra parte, el sustrato pudo contener algún elemento tóxico, debido que las plantas al final del experimento presentaron necrosis en las hojas (Figura 12), sin embargo no se cuenta con el análisis de este sustrato. Síntomas similares se observaron en plantas de haba (*Vicia faba*), debido a la prolongada aplicación prolongada de sales como cloruro de sodio (NaCl), sulfato de sodio (Na₂SO₄), y cloruro de potasio (KCl), las cuales desarrollaron síntomas de toxicidad, como manchas cloróticas de marchitamiento local, que más tarde se volvieron puntos necróticos (Slabu, *et al.*, 2009).

En cuanto al número de hojas de las plantas de axihuitl a los 180 días hubo un incremento, tanto en T2 y T4, con respecto al conteo de hojas presentado a los 30, 60, 90, 120 y 150 días. Los tratamientos *Rhizophagus intraradices* sin vermicomposta (T1) y *R. intraradices* sin vermicomposta (T3) durante el primero y segundo mes, presentaron diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos sin *R. intraradices* con vermicomposta al 5% (T2) y con *R. intraradices* con vermicomposta al 5% (T4) (Cuadro 6). Transcurrido el segundo mes, los tratamientos que sobrevivieron durante los 180 días a partir de la inoculación (T2 y T4), mostraron diferencias estadísticas (Figura 11), siendo T2 el tratamiento con mayor número de hojas.

Cuadro 6. Efecto de HMA y vermicomposta en el número de hojas de la planta de axihuitl bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Clave	Días después de establecido el experimento					
		30	60	90	120	150	180
T1	Sin RI ver 0%	0.7 b	5 b	-	-	-	-
T2	Sin RI ver 5%	1.4 a	31.7 a	34.7 a	25.7 a	37.5 a	60.5 a
T3	Con RI ver 0%	0.69 b	4.6 b	-	-	-	-
T4	Con RI ver 5%	1.2 a	26.7 a	22.2 b	14.2 b	35.7 a	44.7 b

T1 sin MO sin inóculo *R. intraradices*; T2 con MO sin inóculo *R. intraradices*; T3 sin MO con inóculo *R. intraradices* y T4 con MO e inóculo *R. intraradices*. Diferencias obtenidas mediante prueba de Student. Los tratamientos sin valores no sobrevivieron a estas fechas.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



Figura 11. Comparación de plantas de axihuitl a los 180 días de establecido el experimento. A) Plantas con vermicomposta al 5% y sin HMA; B) Plantas con vermicomposta 5% y con HMA.

7.1.2 Efecto de HMA y MO en el crecimiento de axihuitl observado en variables de respuesta de muestreo destructivo.

En las variables de crecimiento de longitud y volumen de raíz (Figura 12) y biomasa fresca total, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos sin *Rhizophagus intraradices* con vermicomposta al 5% (T2) y con *R. intraradices* con vermicomposta al 5% (T4), sin embargo para área foliar y peso seco total si se presentaron diferencias estadísticas entre estos tratamientos (Cuadro 7), siendo T2 que alcanzó el mayor peso seco. Resultados en cuanto al encubrimiento probable sobre el efecto de los HMA en el crecimiento de las plantas, debido al alto contenido de materia orgánica, se apreciaron en un trabajo con diferentes dosis de vermicomposta, donde se aplicó 6% de MO en plantas de chile serrano y se inocularon con *Glomus* sp., en los cuales no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento (Manjarrez *et al.*, 1999).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Cuadro 7. Efecto de la materia orgánica y micorrizas en el crecimiento de las plantas de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 180 días después de establecido el experimento.

Tratamiento	Volumen raíz (mL)	Longitud raíz (cm)	Área foliar (cm ²)	Peso total (g)		Colonización HMA (%)
				Fresco	Seco	
T1 Sin RI ver 0%	-	-	-	-	-	-
T2 Sin RI ver 5%	19.7 a	31.1 a	141.5 a	40.0 a	8.9 b	-
T3 Con RI ver 0%	-	-	-	-	-	-
T4 Con RI ver 5%	17 a	28.1 a	114.0 b	36.9 a	7.1 a	26%

T1 sin MO sin inóculo *R. intraradices*; T2 con MO sin inóculo *R. intraradices*; T3 sin MO con inóculo *R. intraradices* y T4 con MO e inóculo *R. intraradices* Medias con letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$). Los tratamientos sin valores no sobrevivieron al final del experimento.



Figura 12. Efecto de la vermicomposta y HMA sobre el crecimiento de raíces de plantas de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 180 días de establecido el experimento. (A) Tratamiento con materia orgánica sin HMA y (B) Tratamiento con materia orgánica con HMA.

El porcentaje de colonización del tratamiento con *R. intraradices* fue del 26%, porcentaje considerado relativamente bajo respecto a lo reportado en otros trabajos, donde especies vegetales han presentado hasta un 90% de colonización como *Catharanthus roseus* y *Echinacea purpurea* (Araim *et al.*, 2009; Andrade, 2013). Este porcentaje de colonización se presentó en un periodo menor de tiempo, donde el experimento solo permaneció tres meses (Araim *et al.*, 2009), con respecto al que se llevó a cabo en este experimento que constó de seis

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

meses en condiciones de invernadero. Sin embargo, este porcentaje pudiera indicar una preferencia menor de *E. aschembornianum* con esta especie de HMA, como lo indica Lata et al. (2003), quienes en un estudio con diferentes especies de HMA *Glomus mossae* y *Scutellospora fulgida*, observaron preferencia y porcentajes de colonización del 83 al 92% en la planta *Echinacea pallida*. Además, se conoce que la materia orgánica del suelo influye en las micorrizas arbusculares (Gryndler et al., 2009), como se pudo observar en la aplicación de vermicomposta e inóculos de *G. albida* en plantas de *Passiflora alata*, donde estos dos factores presentaron una interacción negativa en el crecimiento de la planta, observándose que si se aumentaban las dosis de la vermicomposta, había una disminución de los HMA, lo que probablemente se tradujo en una competencia del hongo micorrízico con la alta concentración de P contenido en la vermicomposta (Oliveira, 2014).

Algunas de las estructuras de *Rhizophagus intraradices* observadas en las raíces de las plantas de axihuitl después de los 180 días de establecido el experimento, bajo condiciones de invernadero se presentan en la Figura 13.

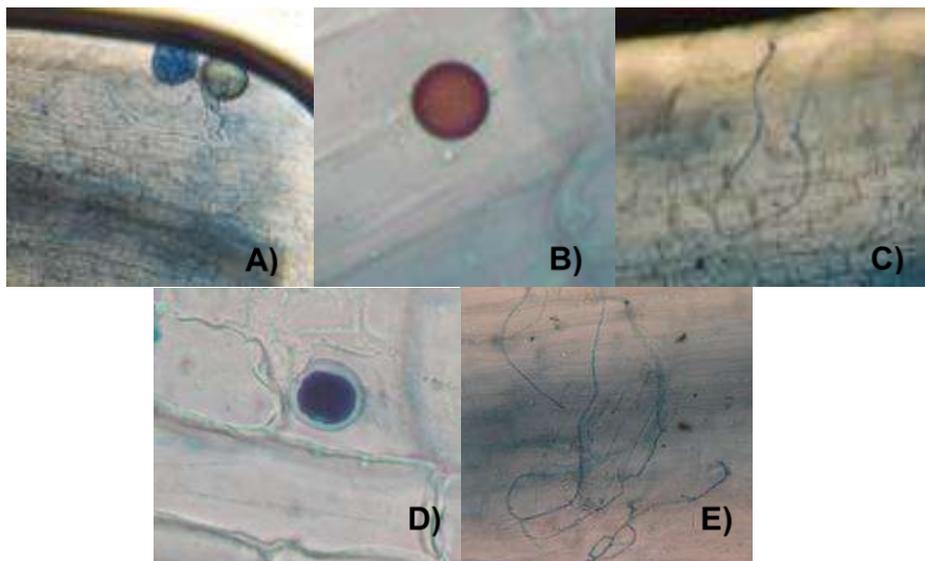


Figura 13. Estructuras de *Rhizophagus intraradices* en raíces de plantas de axihuitl. A y B, esporas; C y D, micelio; E, vesícula.

7.1.3 *Análisis de los factores HMA y MO para las variables de crecimiento del axihuitl.*

El análisis factorial en el crecimiento de las plantas de axihuitl mostró que el factor materia orgánica (MO) tuvo efecto significativo en el crecimiento vegetal, pero las interacciones entre los factores MO y HMA no fue significativa, indicando que no hubo relación entre estas variables como influencia sobre el crecimiento de la planta, sin embargo, tanto la MO como los HMA mostraron una interacción significativa en cuanto al efecto en la variable de la colonización micorrízica (Cuadro 8). Estos resultados fueron similares a los presentados en un estudio donde se aplicó fertilización fosfatada en papaya, pero el HMA que se inoculó fue *Glomus* sp., el cual mostró su participación en la captación, absorción y movilización de los nutrimentos en el sustrato (Quiñones *et al.*, 2012), sin embargo, en ese estudio el HMA tuvo efecto en el incremento de las plantas, pero en el presente trabajo no fue de esta manera, ya que el tratamiento con MO que no tuvo HMA presentó un mayor incremento con respecto al tratamiento que si se inoculó con el HMA *R. intraradices*. Esto sugiere que las plantas de axihuitl tienen la capacidad de absorber los nutrimentos, sin ayuda de esta especie de HMA, a diferencia de las plantas micotróficas como la papaya, que carece de esta capacidad (Quiñones *et al.*, 2012).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Cuadro 8. Valores de probabilidad de los estadísticos de prueba del análisis de varianza para los factores HMA y MO en las distintas variables de crecimiento del axihuitl.

Variables de crecimiento	Valor de probabilidad (P) del estadístico F		Interacciones (HMA)*(MO)
	HMA	MO	
Altura de planta	0.08	0.00	0.08
Diámetro del tallo	0.27	0.00	0.27
Número de hojas	2.74	1.91	2.74
Volumen de raíz	0.35	0.00	0.35
Longitud de raíz	0.38	0.00	0.38
Área foliar	0.48	0.00	0.48
Peso fresco total	0.63	0.00	0.63
Peso seco total	0.30	0.00	0.30
Variable microbiológica			
Colonización micorrízica	0.00	0.00	0.00

Valores de $p < 0.05$ indican efecto estadísticamente significativo.

7.1.4 Extractos acetónicos de axihuitl y su actividad como bactericida.

Los extractos acetónicos obtenidos de los tratamientos T2 (sin HMA/MO 5%) y T4 (RI/MO 5%), aplicados a las cajas Petri, con una concentración de 60 mg mL^{-1} , no mostraron un efecto bactericida, pues no se observó inhibición del crecimiento de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. El control positivo (*P. syringae* pv. *phaseolicola* con medio KB) presentó el crecimiento de la bacteria, mientras que en la caja Petri con el antibiótico-control negativo (cloranfenicol con una concentración de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$) no presentaron crecimiento bacteriano (Figura 14).

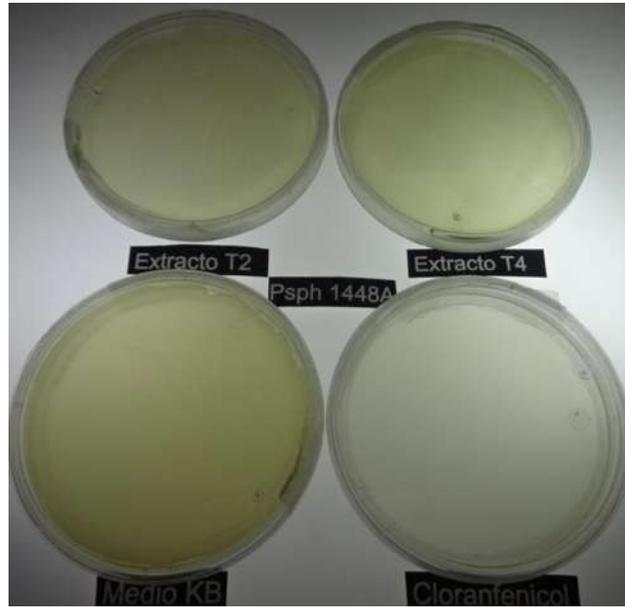


Figura 14. Prueba de inhibición del crecimiento de *P. syringae* pv. *phaseolicola* por compuesto bactericida de extractos de axihuitl proveniente de distintos tratamientos. T2 = extracto de plantas de axihuitl con vermicomposta al 5% y sin HMA; T4 = extracto de plantas de axihuitl con vermicomposta 5% y con HMA.

Estos resultados mostraron que el HMA *R. intraradices*, como la vermicomposta no incrementaron el metabolito secundarios con efecto bactericida. En otros trabajos donde se ha adicionado vermicomposta a plantas medicinales para aumentar la concentración de los metabolitos secundarios, como en *Ardisia escallonoidea* para incrementar la concentración de fenoles y taninos, al término de 6 meses, solo se presentó el incremento en el crecimiento de la planta y en el peso seco, pero no aumentó la concentración de metabolitos secundarios como fenoles y taninos (Molina *et al.*, 2012). Puesto que la planta puede contener diferentes tipos de metabolitos en sí, se puede dar el caso que no todos los metabolitos se incrementen por el hecho de la adición de materia orgánica o inoculación con HMA. En *Artemisa anua*, no se vio afectada la concentración total de terpenos, pero si se encontró un incremento de limoneno y cetona por efecto de la inoculación con *Glomus* sp. (Raparini *et al.*, 2007). Aunque el metabolito con

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

efecto bactericida no se incrementó, quizá otros metabolitos en la planta de axihuitl probablemente pudieron haberse incrementado.

7.2 Efecto de diferentes niveles de materia orgánica y distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento de las plantas y efectividad bactericida de los extractos de axihuitl sobre *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

7.2.1 Dinámicas del crecimiento vegetal del axihuitl por efecto de la MO y HMA.

Las variables de crecimiento evaluadas durante los 180 días de permanencia del experimento en condiciones de invernadero fueron: altura de la planta y diámetro del tallo (Figuras 15 y 16). Los tratamientos a los que no se les adicionó MO (composta a base de cachaza de caña), T3, T6 y T18, no sobrevivieron. Así mismo, las plantas del tratamiento con 2.5% de MO con inóculo de *R. intraradices* murieron antes de cumplir un mes de haberse inoculado. Entre los tratamientos con solo 2.5% de MO presentaron diferencias estadísticamente significativas tanto para la altura de la planta, como para el diámetro del tallo. También entre los tratamientos con solo MO del 5% presentaron diferencias en estas variables. El incremento en la altura de la planta y diámetro del tallo fue superior en los tratamientos T4 (MO 5% con inóculo Cerro del Metate) y T7 (MO 5% con inóculo El Limón) con respecto al resto. En la Figura 17 se muestran los tratamientos con los inóculos de HMA y dos niveles de materia orgánica.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axíhuítl 2015

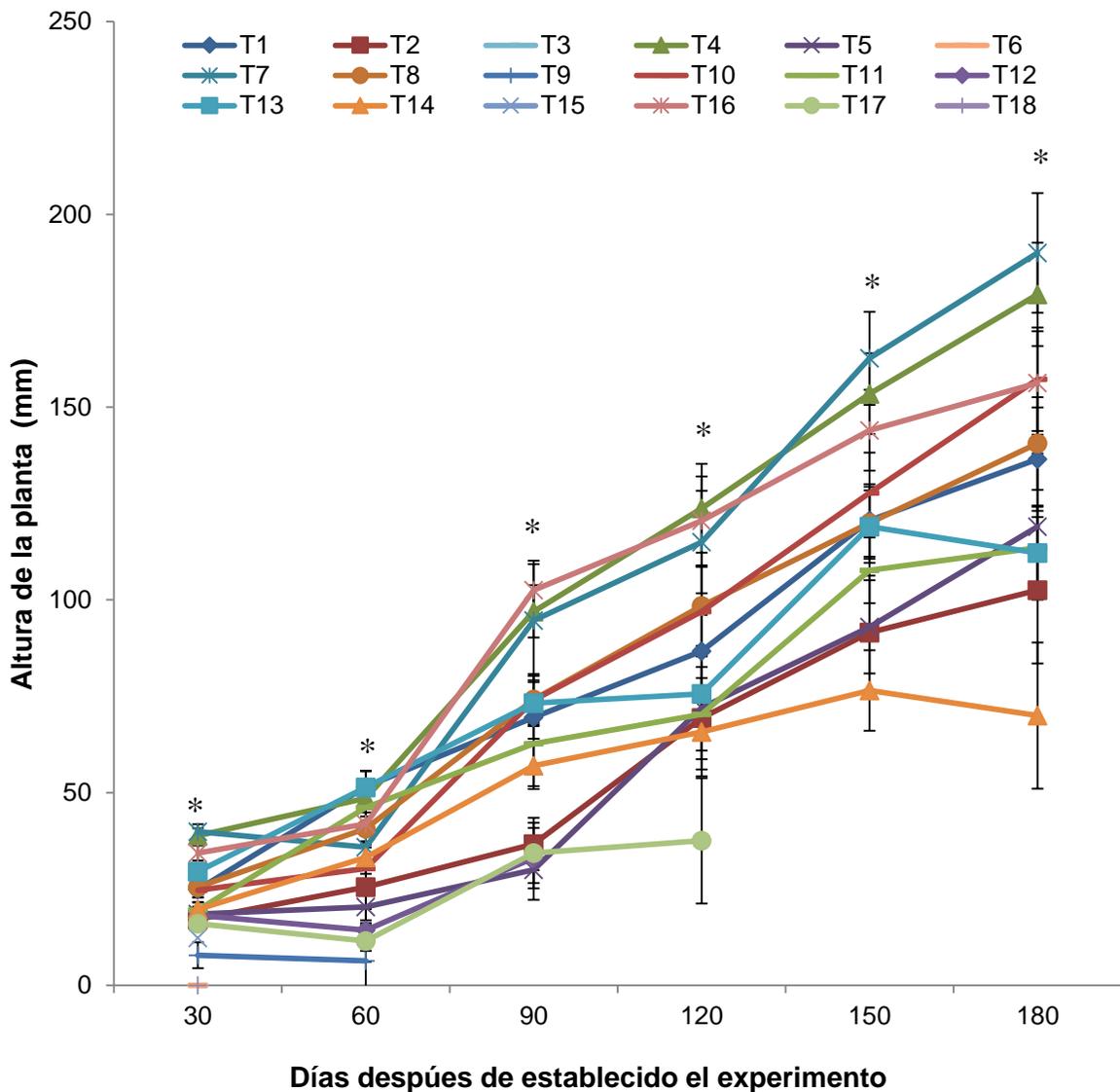


Figura 15. Dinámica del crecimiento de la altura de la planta. T1, MO 5% + *Rhizophagus intraradices*; T2, MO 2.5% + *Rhizophagus intraradices*; T4 MO 5% + Cerro del metate; T5 MO 2.5% + Cerro del metate; T7 MO 5% + El Limón; T8 MO 2.5%+ El Limón; T9 MO 0% + El Limón; T10 MO 5% + Las Campesinas; T11 MO 2.5%+ Las Campesinas; T12 MO 0% + Las Campesinas; T13 MO 5% + Copalcohuítl; T14 MO 2.5%+ Copalcohuítl; T15 MO 0% + Copalcohuítl; T16 MO 5%; T17 MO 2.5%; T18 MO 0% sin HMA. Las barras en cada punto representan \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre tratamientos a esta fecha.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

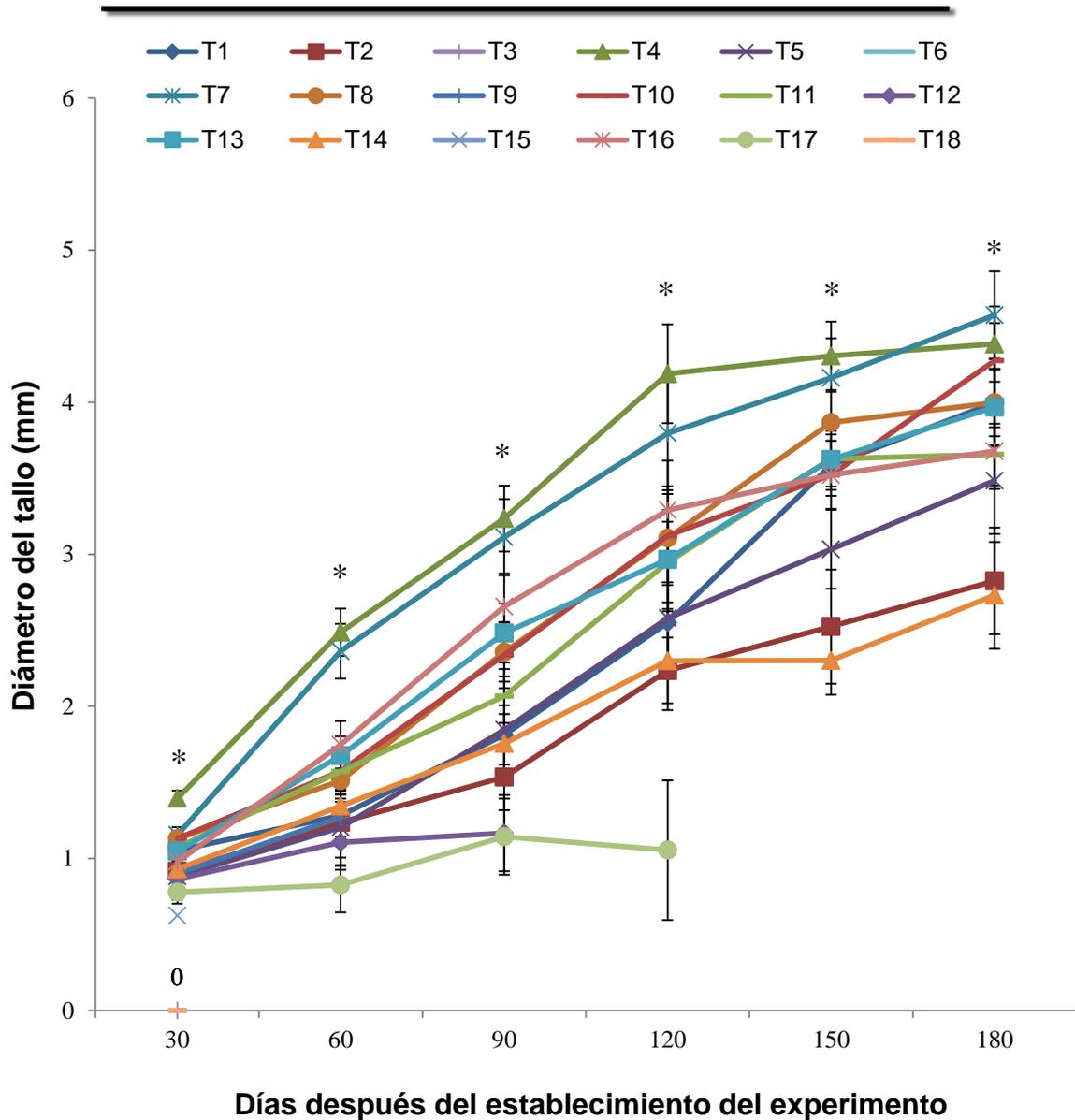


Figura 1. Dinámica de crecimiento del diámetro del tallo. T1, MO 5% + *Rhizophagus intraradices*; T2, MO 2.5% + *Rhizophagus intraradices*; T4 MO 5% + Cerro del metate; T5 MO 2.5% + Cerro del metate; T7 MO 5% + El Limón; T8 MO 2.5%+ El Limón; T9 MO 0% + El Limón; T10 MO 5% + Las Campesinas; T11 MO 2.5%+ Las Campesinas; T12 MO 0% + Las Campesinas; T13 MO 5% + Copalcohuatl; T14 MO 2.5%+ Copalcohuatl; T15 MO 0% + Copalcohuatl; T16 MO 5%; T17 MO 2.5%; T18 MO 0% sin HMA. Las barras en cada punto representan \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre tratamientos a esta fecha.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

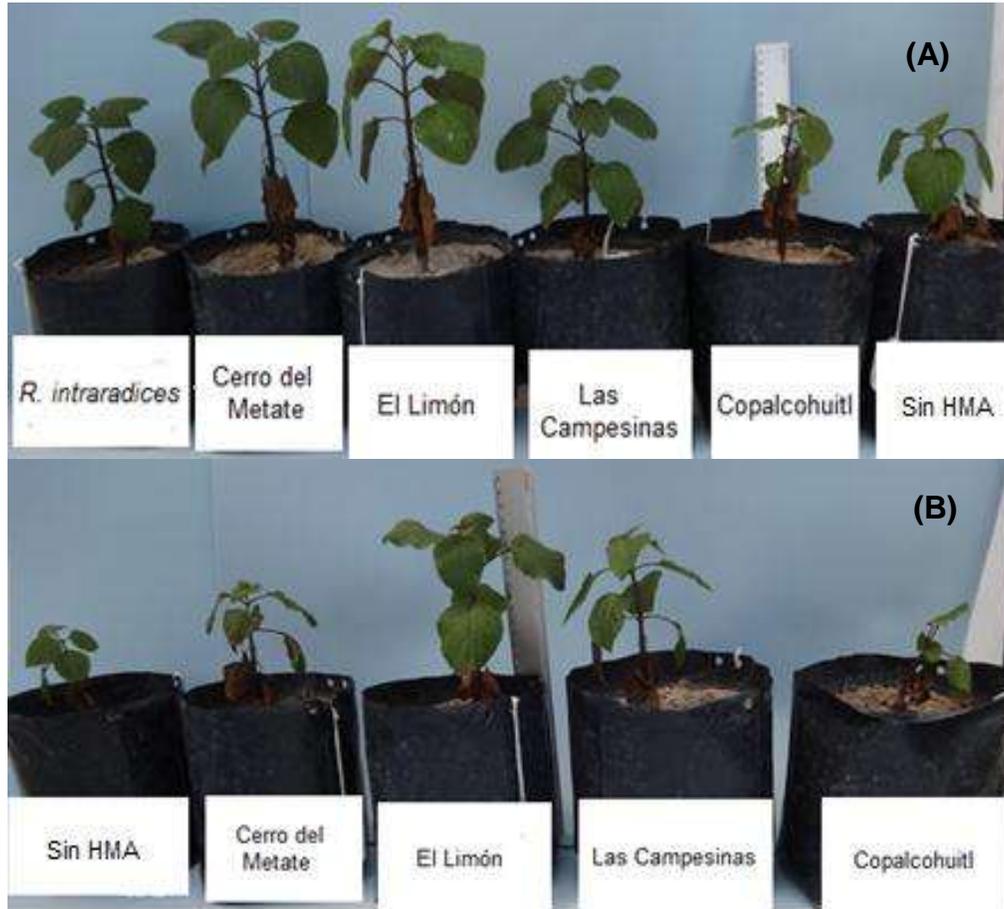


Figura 17. Efecto de la vermicomposta y HMA sobre el crecimiento de axihuitl a los 180 días de inoculadas. A) Tratamientos con HMA y con materia orgánica al 5%. B) Tratamientos con HMA y materia orgánica al 2.5%. Al fondo de las figuras se presenta una regla de 30 cm de longitud.

En cuanto al número de hojas (Cuadro 9), se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. El T7 (El Limón con composta al 5%) presentó mayor número de hojas de los 3 a los 6 meses que se midió esta variable. Entre los 60 y 90 días de haberse inoculado las plantas presentaron un incremento constante en cuanto al número de hojas, pero de los 120 a los 180 días se presentó una disminución en esta variable.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Cuadro 9. Efecto de HMA y composta en el número de hojas de la planta de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 180 días de la inoculación.

Tratamiento Inóculo HMA / MO	Días después de establecido el experimento					
	30	60	90	120	150	180
T1 RI com 5%	6 cd	17 ab	17 cd	9.1 b	9.6 ab	9.3 a
T2 RI com 2.5%	6 cd	9 b	6.4 e	5.6 b	6.5 bc	5 ab
T3 RI com 0%	-	-	-	-	-	-
T4 CM com 5%	8 bc	22 a	25 a	14.5 ab	11 ab	9.5 a
T5 CM com 2.5%	6 cd	14 ab	19 abc	7 b	9.3 ab	7.3 ab
T6 CM com 0%	-	-	-	-	-	-
T7 L com 5%	13 a	22 a	18 bcd	13 ab	13 a	10.3 a
T8 L com 2.5%	10 a	17 ab	21 ab	13 ab	-	-
T9 L com 0%	6 cd	2.6 b	-	-	-	-
T10 Ca com 5%	7 bc	15 ab	19 abc	11.5 ab	9.5 ab	9 a
T11 Ca com 2.5%	6 cd	17 ab	21 ab	9.3 b	9.3 ab	8 ab
T12 Ca com 0%	6.4 cd	3.6 b	-	-	-	-
T13 Co com 5%	6 cd	7 b	9 cde	8.6 b	8.4 abc	6.2 ab
T14 Co com 2.5%	7 bc	13 ab	12 cde	6.7 b	5.2 c	4 b
T15 Co com 0%	-	-	-	-	-	-
T16 Sin HMA/Com 5%	5 d	10 ab	6 de	9.2 b	8.7 abc	7.5 ab
T17 Sin HMA/Com 2.5%	5 d	20 a	12 cde	33.5 a	-	-
T18 Sin HMA/Com 0%	-	-	-	-	-	-

RI (*Rhizophagus intraradices*), CM (Cerro del Metate), L (El Limón), Ca (Campesinas), Co (Copalcohuitl), HMA (hongo micorrízico arbuscular), Com (composta). Medias seguidas de letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$). Los tratamientos sin valores no sobrevivieron a esta fecha.

7.2.2 Efecto de HMA y MO en el crecimiento de axihuitl observado en variables de respuesta de muestreo destructivo.

Los resultados al final del experimento, en cuanto a las variables de crecimiento evaluadas a los 180 días, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Cuadro 10). Cerro del Metate con composta al 5% (T4), presentó el mayor incremento en las variables de volumen y longitud de raíz (Figura 18), peso fresco y peso seco total, a excepción del área foliar, mientras que para esta variable, El Limón con composta al 5% (T7) fue el tratamiento que incrementó mayormente el follaje.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

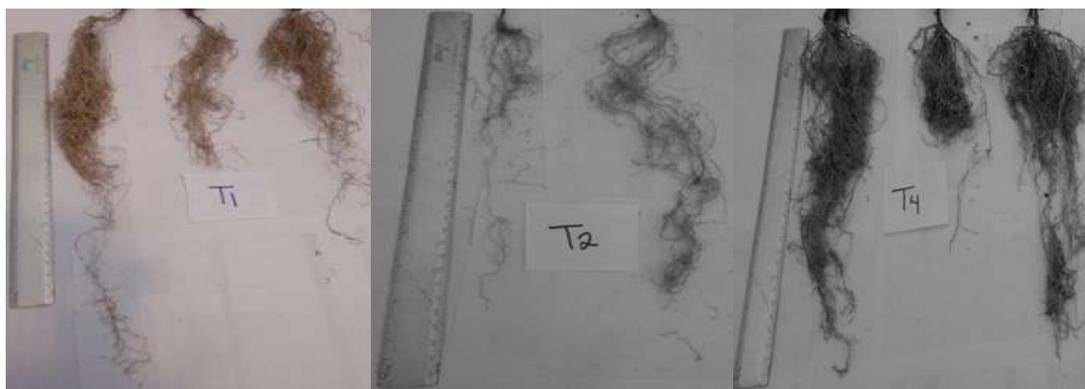
Al respecto, se ha encontrado que el manejo tecnológico de los agroecosistemas de donde provienen los consorcios micorrízicos, puede causar diferencias en cuanto al número de especies en las comunidades de HMA, encontrando que los consorcios más efectivos en el crecimiento de las plantas han sido los que presentan un mayor número de especies de HMA (Trejo, *et al.*, 2011), y, aunque los consorcios provinieron de macetas trampa, al ser inóculos que antes de propagarse provinieron de diferentes localidades, es probable que contaran con diferente número de especies.

Cuadro 10. Efecto de los HMA y materia orgánica en las variables de crecimiento del axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 180 días después de establecido el experimento.

Tratamiento Inóculo HMA / MO	Vol. raíz (mL)	Long. raíz (mm)	Área foliar (cm ²)	Peso (g)		Colonización HMA (%)
				fresco	seco	
T1 RI com 5%	1.46 bc	33 a	43.48 ab	4.96 bc	1.90 bc	33% c
T2 RI com 2.5%	0.65 c	40 a	32.88 cd	1.23 c	0.59 c	31% c
T3 RI com 0%	-	-	-	-	-	-
T4 CM com 5%	2.27 a	46.27 a	79.83 ab	10.66 a	3.78 a	67% b
T5 CM com 2.5%	0.66 c	45.56 a	29.65 cd	2.94 c	0.91 c	63% b
T6 CM com 0%	-	-	-	-	-	-
T7 L com 5%	2.2 a	44.3 a	110.89 a	8.87 ab	3.71 a	90% a
T8 L com 2.5%	0.94 c	41.62 a	55.51 ab	4.21 bc	1.87 bc	86% a
T9 L com 0%	-	-	-	-	-	-
T10 Ca com 5%	1.38 bc	32.72 a	89.11 ab	5.25 bc	1.99 bc	93% a
T11 Ca com 2.5%	0.94 c	41.62 a	55.51 ab	4.05 bc	1.87 bc	86% a
T12 Ca com 0%	-	-	-	-	-	-
T13 Co com 5%	1.1 c	31.86 a	31.64 d	3.73 bc	1.30 c	35% c
T14 Co com 2.5%	0.63 c	45.25 a	4.11 d	0.83 c	0.29 c	15% c
T15 Co com 0%	-	-	-	-	-	-
T16 Sin HMA/Com 5%	1.13 c	45.75 a	24.77 d	3.9 bc	1.09 c	-
T17 SinHMA/Com2.5%	-	-	-	-	-	-
T18 Sin HMA/Com 0%	-	-	-	-	-	-

RI (*Rhizophagus intraradices*), CM (Cerro del Metate), L (El Limón), Ca (Campesinas), Co (Copalcohuatl), HMA (hongo micorrízico arbuscular), Com (composta). Medias seguidas de letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$). Los tratamientos sin valores no sobrevivieron a esta fecha.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



T1 (RI com 5%) T2 (RI com 2.5%) T4 (CM com 5%)
R. intraradices con composta *R. intraradices* con composta Cerro del Metate con composta

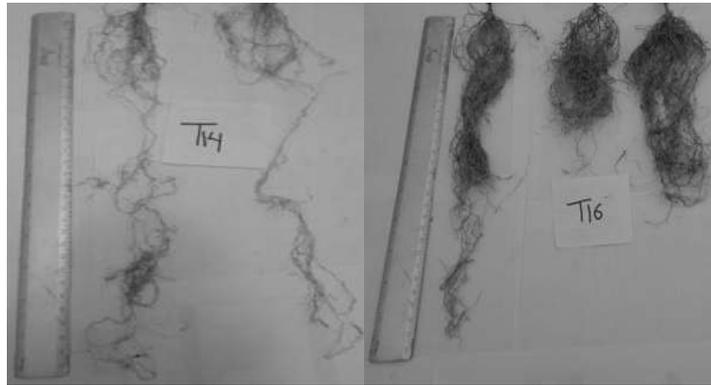


T5 (CM com 2.5%) T7 (L com 5%) T8 (L com 2.5%)
Cerro del Metate con composta El Limón con composta El Limón con composta



Campesinas con composta Campesinas con composta Copalcohutl con composta
T10 (Ca com 5%) T11 (Ca com 2.5%) T13 (Co com 5%)

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



T14 (Co com 2.5%) T16 (Sin HMA/Com 5%)
Copalcohuitl con composta Sin hongo micorrízico
con composta

Figura 18. Efecto de los tratamientos sobre la longitud de raíz de axihuitl a los 180 días del establecimiento del experimento en invernadero.

7.2.3 Porcentaje de colonización micorrízica.

Las plantas de los tratamientos con 2.5 y 5% de materia orgánica, mostraron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de colonización de las raíces de las plantas de axihuitl (Cuadro 10). El tratamiento que presentó mayor porcentaje de colonización (93%) fue T10 (Ca com 5%). Gryndler et al. (2009) mostraron que cantidades relativamente pequeñas de materia orgánica pueden disminuir el crecimiento de los HMA en las raíces, lo cual se apreció en tratamientos a los que se les adicionó solo el 2.5% de MO, que presentaron porcentajes de colonización del 63% (T5) y 83% (T8 y T11), mientras que tratamientos con 5% de MO presentaron porcentajes menores, del 33% (T1) y 35% (T13). En las Figuras 19 y 20 se muestran algunas estructuras fúngicas de los tratamientos con 2.5% y 5% de MO.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

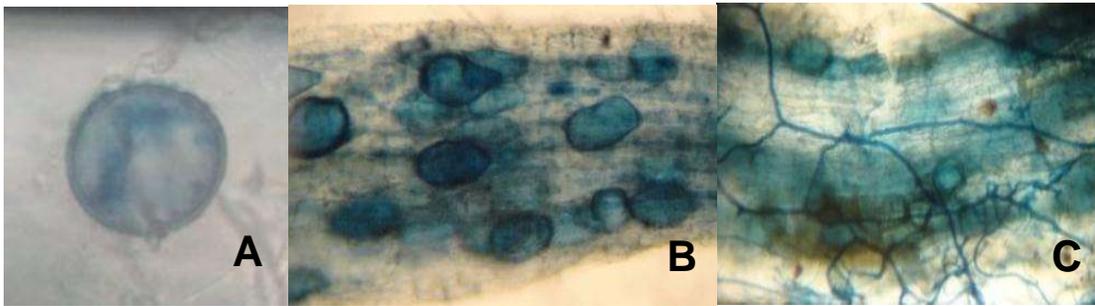


Figura 19. Estructuras de HMA en raíces de plantas de axihuitl colonizadas por HMA del inóculo Cerro del Metate, tratadas con 5% de materia orgánica. A) y B) vesículas, C) micelio y vesículas.

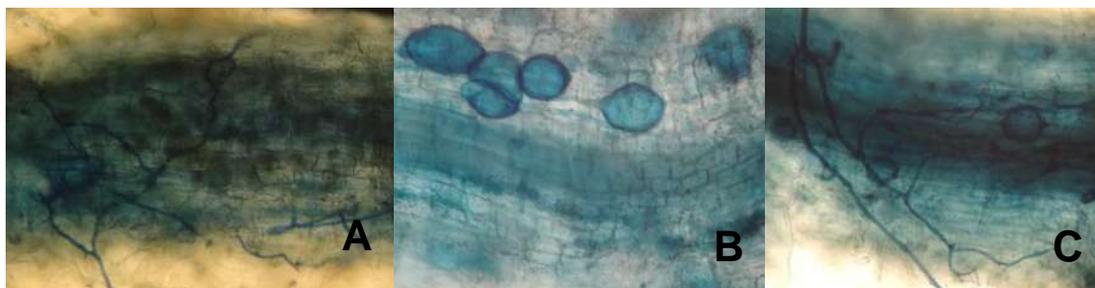


Figura 20. Estructuras en raíces de plantas de axihuitl colonizadas por HMA del inóculo El Limón, tratadas con 2.5% de materia orgánica. A) Micelio, B) vesículas, C) micelio y vesículas.

Los diferentes porcentajes de colonización pudieran estar reflejando la posible especificidad que presenta la planta en la señalización para el intercambio simbiótico que emiten las raíces para los distintos géneros y especies de HMA contenidos en los inóculos micorrízicos (Rodríguez *et al.*, 2004), en conjunto con los nutrimentos contenidos en la materia orgánica aplicada al sustrato (Martínez *et al.*, 2013).

7.2.4 Análisis de los factores HMA y MO sobre las variables de crecimiento del axihuitl.

De los factores evaluados en este experimento, el factor HMA no mostró diferencias significativas para las variables de crecimiento, a excepción del peso seco total, mientras que la MO fue estadísticamente significativa para todas las variables de crecimiento (Cuadro 11). La interacción entre los factores HMA y MO no fue significativa para las variables de crecimiento, lo cual concuerda con un estudio en *Plantago lanceolata* y *Lolium perenne*, adicionadas con HMA y materia orgánica, tampoco presentaron una interacción significativa entre estos factores (Hodge, 2003). En contraste la adición de materia orgánica en *Leucaena diversifolia*, promovió favorablemente el efecto de los HMA en el incremento de la biomasa vegetal (Shrestha *et al.*, 2007). Sin embargo, para la variable microbiológica fue significativo el factor MO y el factor HMA, así mismo, la interacción entre estos dos factores tuvieron un efecto significativo para que los HMA colonizaran las plantas. Daynes *et al.* (2013), mencionan que son tres los factores que requiere el HMA como parte de su estabilización y que haya una respuesta favorable en el crecimiento de las plantas. Estos son, las partículas de la materia orgánica, y materiales húmicos presentes en el sustrato, las raíces de las plantas que interactúan físicamente con el sustrato y las hifas del HMA, ya que estos son factores modifican la estructura del suelo y repercuten en la nutrición de la planta, como se ha encontrado que el carbono orgánico en el suelo es más alto, que cuando falta alguno de estos factores.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Cuadro 11. Valores de probabilidad de los estadísticos de prueba del análisis de varianza para los factores HMA y MO en las distintas variables de crecimiento del axihuitl.

Variables de crecimiento	Valor de probabilidad (P) del estadístico F		Interacciones (HMA)*(MO)
	HMA	MO	
Altura de planta	0.28	0.00	0.28
Diámetro del tallo	0.18	0.00	0.18
Número de hojas	0.21	0.00	0.21
Volumen de raíz	0.25	0.00	0.25
Longitud de raíz	0.37	0.00	0.37
Área foliar	0.11	0.00	0.11
Peso fresco total	0.15	0.00	0.15
Peso seco total	0.07	0.02	0.17
Variable microbiológica			
Colonización micorrízica	0.00	0.01	0.01

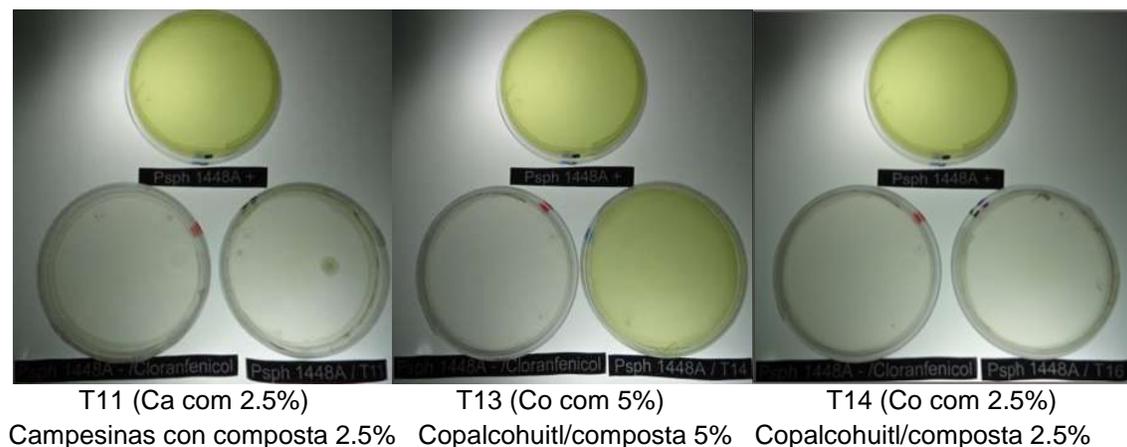
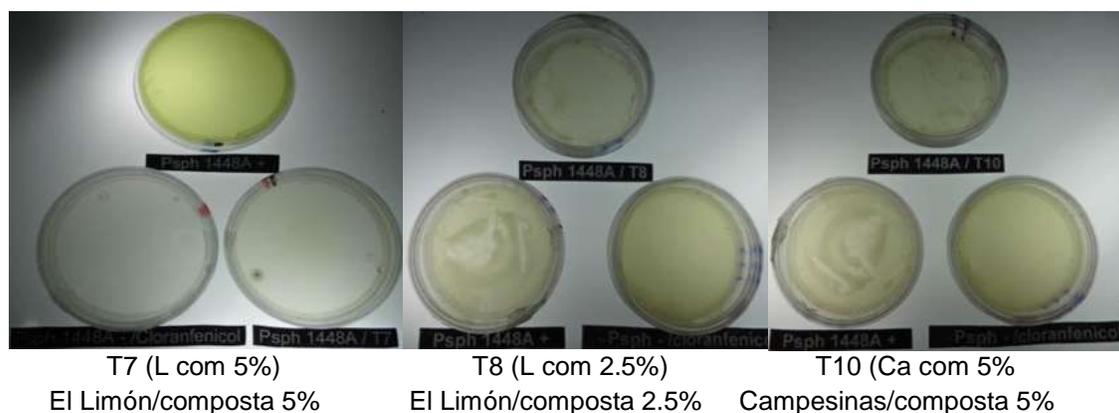
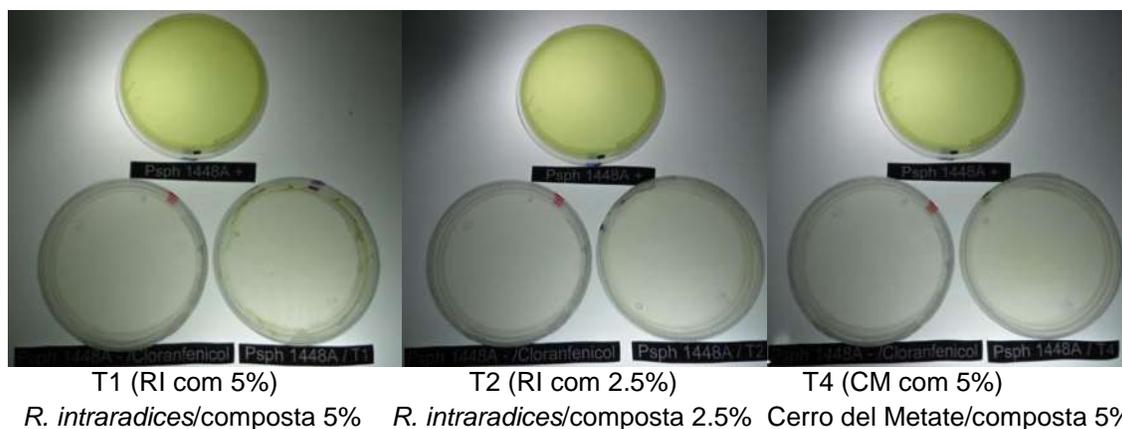
Valores de $p < 0.05$ indican efecto estadísticamente significativo.

7.2.5 Efecto de HMA y MO en la concentración de la actividad biológica bactericida de extractos acetónicos de axihuitl.

Los extractos aplicados con una concentración de 60 mg mL⁻¹ (concentración menor a la conocida de 80 mg mL⁻¹ como mínima inhibitoria) que incrementaron la actividad biológica bactericida fueron los tratamientos (T2) *R. intraradices* con composta al 2.5%, (T4) Cerro del Metate con composta al 5 y (T16) sin HMA con composta al 5% (Figura 21), lo cual se observó en la ausencia de la coloración amarillo fluorescente, que es indicativo del crecimiento de la bacteria *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Este efecto se observó a partir de las 24 h de que se aplicaron los tratamientos en las cajas Petri y se corroboró el mismo efecto hasta las 72 h. Los cajas Petri de los tratamientos (T8) El Limón con composta al 2.5%, (T10) Las Campesinas con composta al 5% y (T13) Copalcohuatl con composta al 5%, presentaron crecimiento bacteriano en las cajas del control negativo, lo cual pudo

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

deberse a la aplicación de una concentración menor, por falta de precisión cuando se colocó el antibiótico.



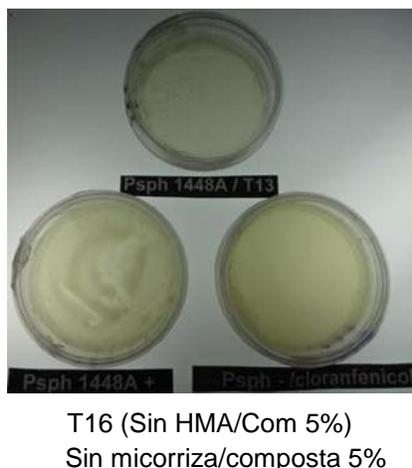


Figura 21. Pruebas de inhibición bacteriana con extractos de axihuitl con una concentración de 60 mg mL^{-1} . Los tratamientos donde no se presentó crecimiento bacteriano fueron indicativo de que el extracto incrementó la concentración de los compuestos bactericidas. Los controles positivos con solo bacteria se indican con la etiqueta PspH 1448A^a y presentan coloración amarillo fosforescente que indica crecimiento bacteriano. El control negativo presenta la etiqueta PspH 1448A^a-Cloranfenicol, donde se presenta transparencia no hubo crecimiento bacteriano. Los tratamientos con el extracto se indican con la etiqueta PspH 1448A^a/ T.

7.2.6 Análisis de correlación entre el crecimiento vegetal, presencia de HMA e inhibición del crecimiento bacteriano por parte de extractos de axihuitl.

El análisis de correlación del peso fresco y peso seco, con respecto al porcentaje de colonización, mostraron una correlación positiva. Estos resultados fueron estadísticamente significativos, indicando en los valores de la correlación que a mayor porcentaje de colonización, mayor fue el incremento en la biomasa vegetal (Cuadro 12). Sin embargo, los pesos fresco y seco no presentaron una correlación significativa en relación con la inhibición bacteriana. Así mismo, la colonización micorrízica y la inhibición bacteriana no presentaron una correlación significativa. Aunque las plantas de Axihuitl incrementaron la biomasa por efecto

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

de la colonización de los HMA, estos resultados mostraron que no hubo una relación en cuanto a estas variables con respecto a la inhibición de la bacteria, Un trabajo de Zubek (2015), con la planta *Viola tricolor* L. reporta que ciertas especies de HMA tuvieron un efecto en el incremento de compuestos de metabolismo secundario, así como de algunos minerales, ya que en las plantas con *Rhizophagus irregularis*, tenían mayores concentraciones de P, Zn, Mg, y Ca, así como de ácido p-hidroxibenzoico, mientras que *V. tricolor* no mostró respuesta a *Funneliformis mosseae* y el control con estas dos especies de HMA incrementaron las concentraciones de Cu y Mg.

Cuadro 12. Valores de coeficientes de correlación de Spearman (r) entre las variables de pesos fresco aéreo, peso seco aéreo, inhibición bacteriana y colonización micorrízica.

Variables	Inhibición	Colonización	Peso seco (parte aérea)
Peso fresco (parte aérea)	0.1533 (P= 0.1128)	0.7681 (P= 0.00)	0.9102 (P= 0.00)
Inhibición bacteriana		0.0337 (P= 0.7277)	0.0993 (P= 0.3042)
Colonización micorrízica			0.7788 (P= 0.00)

Valores-P abajo de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95.0%.

7.3 Evaluación del efecto de seis inóculos de HMA, dos fuentes de materia orgánica y dos niveles de materia orgánica en el crecimiento y la concentración de sustancias bioactivas del axihuitl.

7.3.1 Dinámica del crecimiento vegetal del axihuitl bajo condiciones de invernadero.

En este experimento todos los tratamientos sobrevivieron y mostraron diferencias estadísticamente significativas. Para la variable altura de la planta

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

(Figura 22), (T1) *R. intraradices* con composta al 5% fue el que presentó una mayor altura.

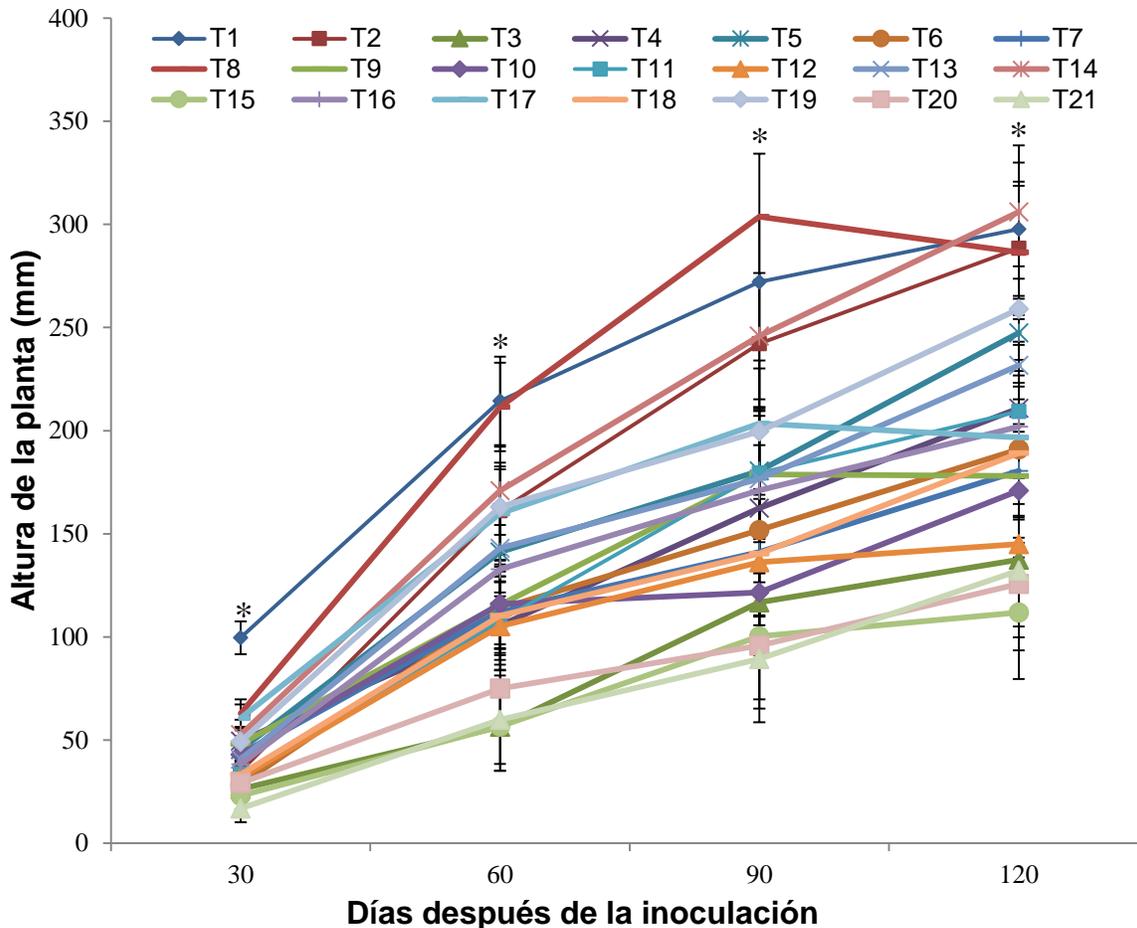


Figura 22. Dinámica de crecimiento de altura de la planta. T1, Composta 5% + *Rhizophagus intraradices*; T2, Suelo Morelos 5% + *Rhizophagus intraradices*; T3, MO 0%+ *Rhizophagus intraradices*; T4, Composta 5% + Las Campesinas; T5, Suelo Morelos 5% + Las Campesinas; T6, MO 0% + Las Campesinas; T7, Composta 5% + Cerro del Metate; T8, Suelo de Morelos 5%+ Cerro del Metate; T9, MO 0%+ Cerro del Metate; T10, Composta 5% + Copalcohuilt; T11, Suelo de Morelos 5%+ Copalcohuilt; T12, MO 0% + Copalcohuilt; T13 Composta 5% + Antiguas Vías del Tren; T14, Suelo de Morelos 5%+ Antiguas Vías del Tren; T15, MO 0% + Antiguas Vías del Tren; T16, Composta 5% + Tezontitla; T17, Suelo de Morelos 5% + Tezontitla; T18, MO 0% + Tezontitla; T19 Composta 5% sin HMA; T20, Suelo Morelos 5% sin HMA; T21, Sin MO sin HMA. Las barras en cada punto representan \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre tratamientos a esta fecha.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Para el diámetro del tallo, el mayor incremento (Figura 23) se presentó en (T1) *R. intraradices* con composta, a los 120 días de inoculadas las plantas.

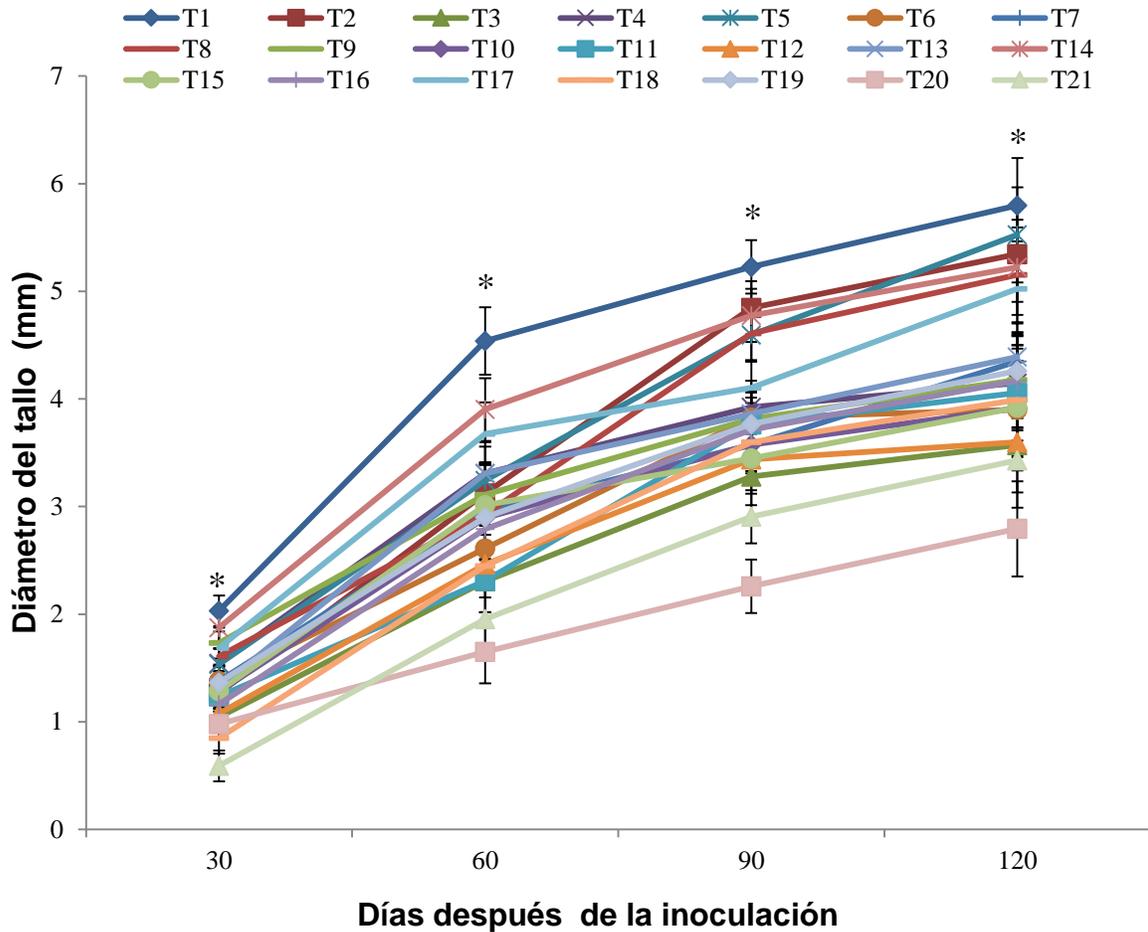


Figura 23. Dinámica de crecimiento del diámetro del tallo. T1, Composta 5% + *Rhizophagus intraradices*; T2, Suelo Morelos 5% + *Rhizophagus intraradices*; T3, MO 0%+ *Rhizophagus intraradices*; T4, Composta 5% + Las Campesinas; T5, Suelo Morelos 5% + Las Campesinas; T6, MO 0% + Las Campesinas; T7, Composta 5% + Cerro del Metate; T8, Suelo de Morelos 5%+ Cerro del Metate; T9, MO 0%+ Cerro del Metate; T10, Composta 5% + Copalcohuitl; T11, Suelo de Morelos 5%+ Copalcohuitl; T12, MO 0% + Copalcohuitl; T13 Composta 5% + Antiguas Vías del Tren; T14, Suelo de Morelos 5%+ Antiguas Vías del Tren; T15, MO 0% + Antiguas Vías del Tren; T16, Composta 5% + Tezontitla; T17, Suelo de Morelos 5% + Tezontitla; T18, MO 0% + Tezontitla; T19 Composta 5% sin HMA; T20, Suelo Morelos 5% sin HMA; T21, Sin MO sin HMA. Las barras en cada punto representan \pm desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas entre tratamientos a esta fecha.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

En cuanto al número de hojas (Cuadro 13), no se logró observar alguna tendencia respecto a los parámetros anteriores debido a la caída de las hojas de las plantas. Los tratamientos presentaron diferencias estadísticas en cada fecha de muestreo. T1 (*R. intraradices* con suelo de Morelos al 5%), presentó el mayor número de hojas en cada mes con respecto al resto de los tratamientos, sin embargo se apreció que, durante los 60 y 90 días, se incrementó el número de hojas, pero a los 120 días hubo una disminución (Figura 24).

Cuadro 13. Efecto de HMA y composta en el número de hojas de la planta de axihuitl bajo condiciones de invernadero a los 120 días de la inoculación.

Tratamiento Inóculo de HMA / MO	Días después de establecido el experimento			
	30	60	90	120
T1 RI Com 5%	13 a	19 a	20 a	13.8 a
T2 RI SM 5%	6.4 bc	14.3 abc	16 ab	12.2 ab
T3 RI MO 0%	6.2 c	10.1 bcd	9.7 de	8.5 bcd
T4 Ca Com 5%	8.7 abc	12.7 bcd	10.7 de	10.7 abc
T5 Ca SM 5%	7.5 bc	15 ab	11.5 cde	8.5 bcd
T6 Ca MO 0%	7.4 bc	13.3 bcd	10.3 de	9.9 abc
T7 CM Com 5%	7.8 bc	11.7 bcd	9.1 de	10.4 abc
T8 CM SM 5%	10.2ab	13.2 bcd	12.1 bcd	10.9 abc
T9 CM MO 0%	10.4ab	12 bcd	11.4 cde	9.1 abc
T10 CO Com 5%	7.5 bc	13.2 bcd	9.5 de	9.2 abc
T11 CO SM 5%	7.1 bc	12.1 bcd	15 bc	9.1 abc
T12 CO MO 0%	7.1 bc	9.5 cd	10.4 de	7.8 cd
T13 AV Com 5%	7.4 bc	12.7 bcd	12 bcd	10.1 abc
T14 AV SM 5%	9 abc	14.5 abc	15 bc	11 abc
T15 AV MO 0%	4.5 c	11.2 bcd	10.6 acde	3.7 e
T16 Te Com 5%	7.1 bc	12.1 bcd	11.1 acde	9.9 abc
T17 Te SM 5%	8.5 abc	13.4 bcd	13.1 bcd	12.8 ab
T18 Te MO 0%	6 abc	11.2 bcd	10.3 de	7 d
T19 Sin HMA/Com 5%	7.2 bc	12.1 bcd	10.5 de	10.5 abc
T20 Sin HMA/SM 5%	5.5 c	8.5 d	9 de	9.2 abc
T21 Sin HMA/MO 0%	5.7 c	9.7 bcd	8.8 e	8.2 bcd

RI (*Rhizophagus intraradices*), Ca (Campesinas), CM (Cerro del Metate), Co (Copalcohuatl), AV (Antiguas Vías del Tren), Te (Tezontitla), HMA (hongo micorrízico arbuscular), Com (composta), SM (Suelo de Morelos). Medias con letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

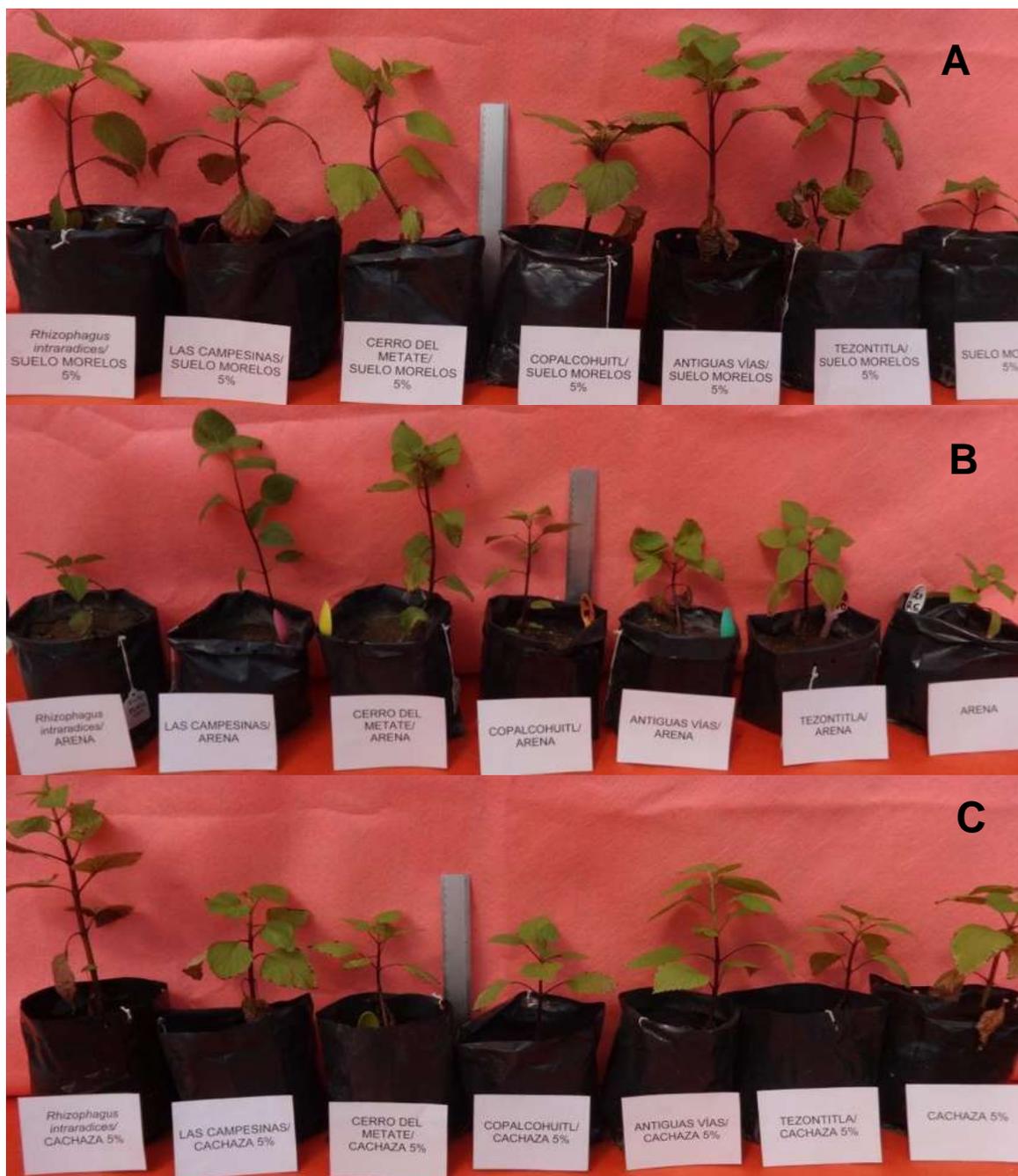


Figura 24. Plantas de axihuitl a los 120 días después de establecido el experimento bajo condiciones de invernadero. A) Tratamientos con suelo de Morelos al 5 %. B) Tratamientos sin materia orgánica. C) Tratamientos con composta a base de cachaza de caña al 5%

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

7.3.2 Efecto de HMA y MO en el crecimiento de axihuitl observado en variables de respuesta de muestreo destructivo.

Los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas en las variables evaluadas en el muestreo destructivo (Cuadro 14). T1 (*R. intraradices* con composta 5%) presentó el mayor volumen y longitud de raíz, así como mayor peso seco total, a diferencia de los demás tratamientos, mientras que el área foliar fue mayor en el tratamiento T2 (*R. intraradices* con suelo de Morelos 5%). El incremento en cuanto a la biomasa vegetal con *R. intraradices* ya se ha observado en trabajos con plantas medicinales, presentando incluso, un crecimiento tres veces mayor al tratamiento que no se inoculó con el hongo (Araim *et al.*, 2009). En la Figura 25, se observa como la longitud de las raíces fue similar en la mayoría de las plantas, sin embargo, se observaron diferencias en cuanto al volumen, correspondientes a los tratamientos con nivel de materia orgánica del 5%, y las raíces de menor volumen, correspondientes a los tratamientos que no tuvieron materia orgánica, solamente inóculo de HMA.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Cuadro 14. Efecto de los HMA y materia orgánica en las variables de crecimiento del axihuitl 120 días después de establecido el experimento bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento Inóculo de HMA / MO	Vol. Raíz (mL)	Long. Raíz (mm)	Área foliar (cm ²)	Peso (g)	
				Fresco	Seco
T1 RI Com 5%	5.1 a	51.2 a	164.4 bc	24.0 a	4.6 a
T2 RI SM 5%	2.4 b	47.8 a	216.5 a	15.0 b	3.6 a
T3 RI MO 0%	0.8 bcd	38.3 a	74.4 cd	3.9 fg	1.0 bc
T4 Ca Com 5%	1.5 bcd	50.1 a	95.8 bc	8.2 def	2.1 ab
T5 Ca SM 5%	2 bc	50.9 a	168.0 ab	15.0 b	3.9 a
T6 Ca MO 0%	0.8 cd	41.2 a	89.5 c	5.0 ef	1.6 bc
T7 CM Com 5%	1.6 bcd	47.7 a	70.5 cd	7.2 def	1.8 bc
T8 CM SM 5%	1.5 bcd	47.3 a	155.2 ab	13.2 bc	3.2 a
T9 CM MO 0%	0.8 cd	37.8 a	121.8 bc	5.1 ef	1.4 bc
T10 CO Com 5%	1.3 bcd	43.8 a	86.1 cd	6.2 def	1.6 bc
T11 CO SM 5%	1.7 bcd	43.5 a	153.0 ab	10.7 cd	3.0 ab
T12 CO MO 0%	1 bcd	39.3 a	74.1 cd	5.0 ef	1.3 bc
T13 AV Com 5%	1.6 bcd	38.0 a	111.4 ab	8.5 def	2.1 ab
T14 AV SM 5%	2.1 bc	44.8 a	182.2 a	14.7 b	3.9 a
T15 AV MO 0%	0.1 d	7.6 b	32.3 d	1.1 g	0.5 c
T16 Te Com 5%	1 bcd	44.5 a	1 bcd	6.8 def	4.5 b
T17 Te SM 5%	2.7 b	40.0 a	195.5 a	14.72 b	4.2 a
T18 Te MO 0%	0.9 bcd	44.8 a	82.8 cd	6.1 ef	1.2 bc
T19 Sin HMA/Com 5%	1.2 bcd	46.05 a	111.6 bc	8.0 def	2.1 ab
T20 Sin HMA/SM 5%	0.8 cd	37.41 a	83.9 cd	4.0 fg	0.9 bc
T21 Sin HMA/MO 0%	0.5 d	37.87 a	78.0 cd	3.5 fg	0.9 bc

RI (*Rhizophagus intraradices*), Ca (Campeñas), CM (Cerro del Metate), Co (Copalcohuatl), AV (Antiguas Vías del Tren), Te (Tezontitla), HMA (hongo micorrízico arbuscular), Com (composta), SM (Suelo de Morelos). Medias con letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



T1

T2

T3

T4

T5

T6

T7



T8

T9

T10

T11

T12

T13

T14

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



Figura 25. Raíces de los 21 tratamientos a los 120 días de establecido el experimento. La escala de cada cuadro en las tiras en blanco y negro es de 1 cm.

El crecimiento en las plantas puede variar dependiendo de la interacción planta-hongo, ya que, ciertas combinaciones de hongos son más o menos compatibles unos de otros con las especies vegetales (Radhika y Rodrigues, 2011). Las razones de las respuestas específicas de los HMA en la colonización fúngica y beneficios que proporcionan a la planta, son probablemente mediadas por una compleja combinación de señales de plantas y hongos a base de sustancias controladas genéticamente (Gianinazzi, 1991).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

7.3.3 Colonización micorrízica del axihuitl bajo distintos tratamientos de MO y HMA.

De los 21 tratamientos, los que presentaron un mayor porcentaje, en cuanto a la colonización micorrízica fue el inóculo Antiguas Vías del Tren con Cachaza 5% y Antiguas Vías del Tren con suelo de Morelos 5% (Cuadro 15 y Figuras 26, 27 y 28).

Cuadro 15. Porcentajes de colonización micorrízica en las raíces de plantas de axihuitl 120 días después de establecido el experimento.

Inóculos de HMA	Colonización micorrízica (%)
T1 RI com 5%	18 ef
T2 RI SM 5%	28 de
T3 RI MO 0%	36 de
T4 Ca com 5%	20 ef
T5 Ca SM 5%	57 ab
T6 Ca MO 0%	26 de
T7 CM com 5%	38 cd
T8 CM SM 5%	51 ab
T9 CM MO 0%	34 de
T10 CO com 5%	22 de
T11 CO SM 5%	50 bc
T12 CO MO 0%	31 de
T13 AV com 5%	61 ab
T14 AV SM 5%	60 ab
T15 AV MO 0%	40 cd
T16 Te com 5%	40 cd
T17 Te SM 5%	54 ab
T18 Te MO 0%	54 ab
T19 Sin HMA/com 5%	-
T20 Sin HMA/SM 5%	-
T21 Sin HMA/MO 0%	-

RI (*Rhizophagus intraradices*), Ca (Campesinas), CM (Cerro del Metate), Co (Copalcohuitl), AV (Antiguas Vías del Tren), Te (Tezontitla), HMA (hongo micorrízico arbuscular), Com (composta), SM (Suelo de Morelos), MO (materia orgánica). Medias con letras diferentes por columnas indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Aunque no hay pruebas claras de la existencia de alguna especificidad entre taxones de HMA y taxones de especies de plantas hospederas (Smith y Read 1997), se pudo observar que algunos inóculos pudieron incrementarse dentro de las raíces. Esto muestra que los inóculos pudieron contener especies micorrízicas, afines a la planta de axihuitl, como se observó en *Andrographis paniculata*, planta que fue inoculada con diferentes especies de HMA, pero fue la especie *Gigaspora albida*, el inóculo que presentó un porcentaje mayor en cuanto a la colonización, con lo cual manifestó la afinidad del hospedero con este hongo (Radhika y Rodrigues, 2011).

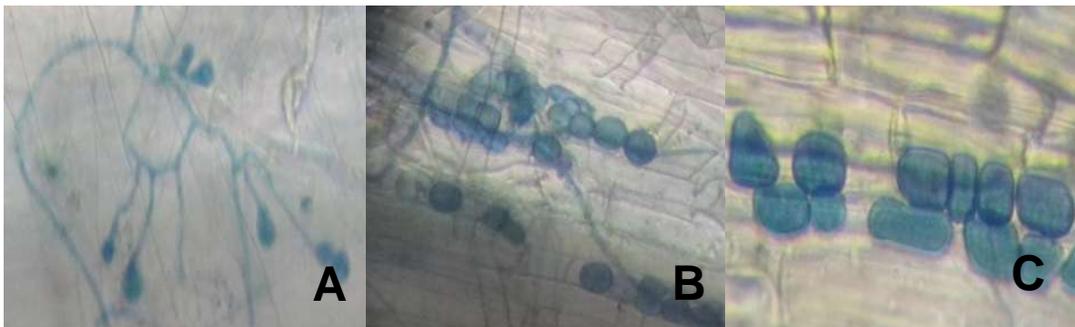


Figura 26. Estructuras de micorriza arbuscular en raíces de plantas de axihuitl del tratamiento Antiguas vías del tren con cachaza al 5%. A) y C) micelio y vesículas, B) vesículas.



Figura 27. Estructuras de micorriza arbuscular en raíces de plantas de axihuitl del tratamiento Las Campesinas con suelo de Morelos 5%. A) y B) vesículas, C) micelio.

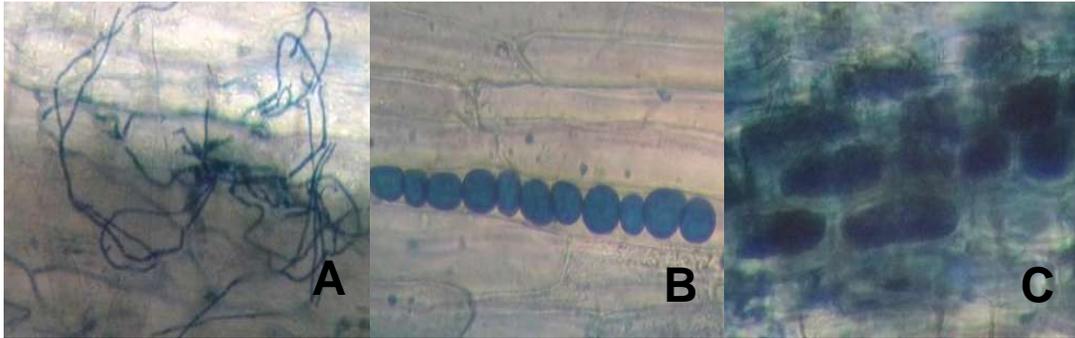


Figura 28. Estructuras de micorriza arbuscular en raíces de plantas de axihuitl del tratamiento Tezontitla sin materia orgánica. A) y B) vesículas y C) micelio.

7.3.4 Análisis de los factores HMA y MO para las variables de crecimiento del axihuitl.

El factor HMA presentó un efecto estadísticamente significativo en las variables de crecimiento de altura de la planta, volumen de raíz, área foliar y peso seco total, mientras que el factor materia orgánica presentó significancia en todas las variables de crecimiento. La interacción entre los HMA y la MO solo se presentó para el peso seco total (Cuadro 16). Estos resultados mostraron que la MO tuvo un efecto mayor en cuanto al crecimiento de la planta. Los factores HMA junto con la MO influyeron en el crecimiento de las plantas, lo cual se reafirma con la significancia estadística en el peso seco total, que mostró ser significativo, sin embargo, esto no fue similar para la variable microbiológica, debido a que para MO no fue un factor que presente una relación entre estas dos variables sobre la colonización. Flores y Cuenca (2004) mencionan que la colonización en las raíces, puede deberse a la afinidad que tengan las especies de HMA contenidas en los consorcios micorrízicos sobre la planta a colonizar.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Cuadro 16. Valores de probabilidad de los estadísticos de prueba del análisis de varianza para los factores HMA y MO en las distintas variables de crecimiento del axihuitl.

Variables de crecimiento	Valor de probabilidad (P) del estadístico F		Interacciones (HMA)*(MO)
	HMA	MO	
Altura de la planta	0.03	0.00	0.58
Diámetro del tallo	0.13	0.00	0.75
Número de hojas	0.63	0.00	0.44
Longitud de raíz	0.45	0.00	0.88
Volumen de raíz	0.00	0.00	0.47
Área foliar	0.01	0.00	0.48
Peso fresco total	0.32	0.00	0.75
Peso seco total	0.00	0.00	0.02
Variable microbiológica			
Colonización micorrízica	0.00	0.67	0.67

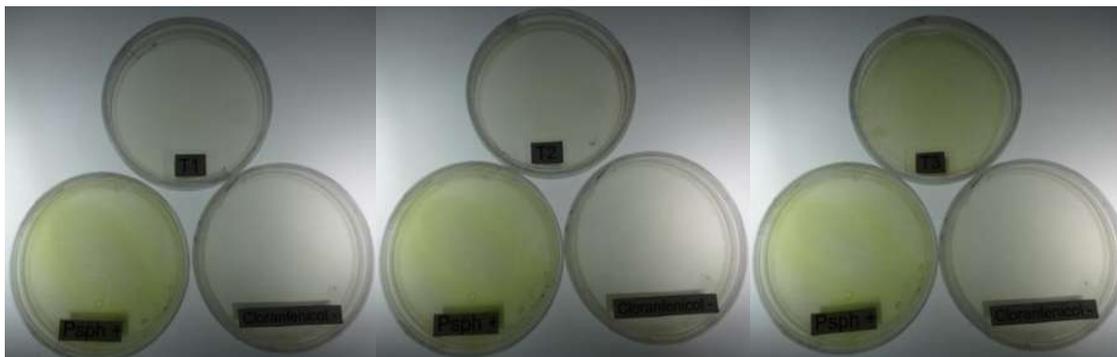
Valores de $p < 0.05$ indican diferencias estadísticamente significativas.

7.3.5 *Pruebas de inhibición del crecimiento de P. syringae pv. pahseolicoa con extracto de axihuitl a una concentración de de 60 mg mL⁻¹ después de 24 horas.*

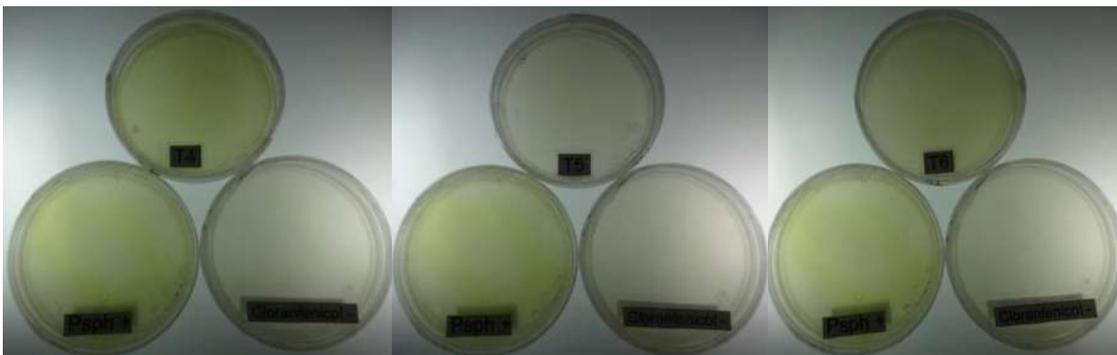
Los extractos se aplicaron a una concentración de 60 mg mL⁻¹ para evaluar si el compuesto bactericida se incrementó, ya que esta concentración aplicada es menor a la concentración ya conocida como mínima inhibitoria (80 mg mL⁻¹).

Los extractos que presentaron un incremento en la actividad bactericida fueron obtenidos de los tratamientos: *R. intraradices* con cachaza 5% (T1), *R. intraradices* con suelo de Morelos 5% (T2) y Las Campesinas con Suelo de Morelos 5% (T5) (Figura 29).

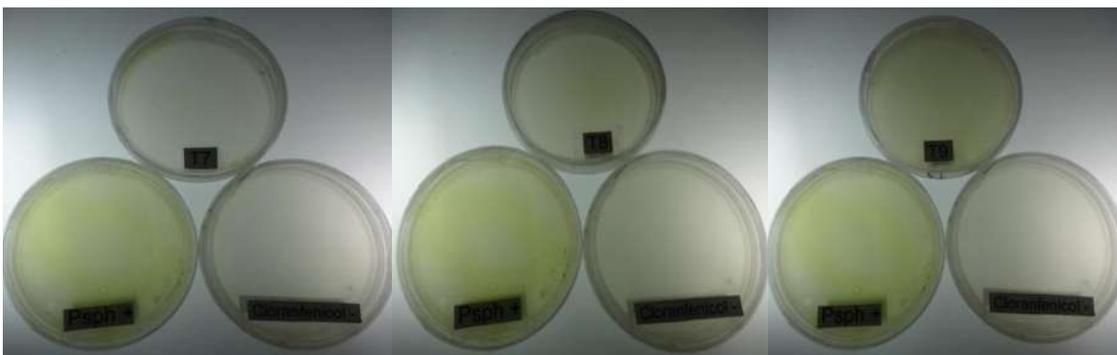
Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



T1(*R. intraradices*/5% cachaza) T2(*R. intraradices*/Suelo Morelos 5%) T3(*R. intraradices*/ MO 0%)

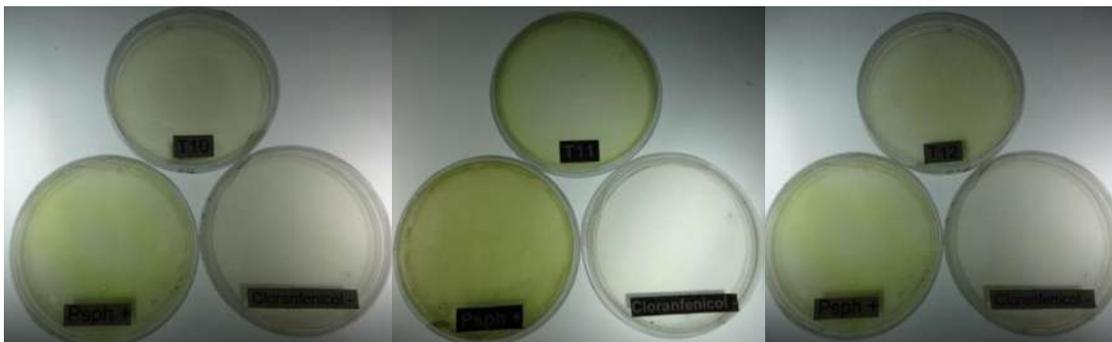


T4(Campesinas/cachaza 5%) T5(Campesinas/Suelo Morelos 5%) T6(Campesinas/MO 0%)

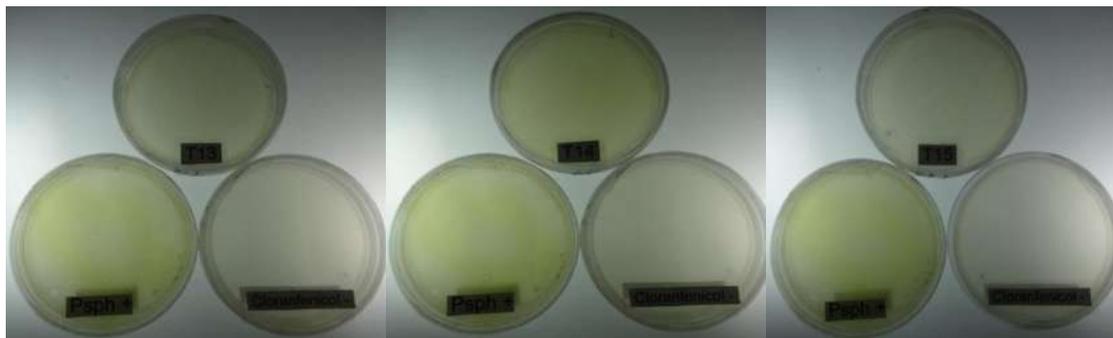


T7(Cerro Metate/cachaza 5%) T8(Cerro Metate/Suelo Morelos 5%) T9 (Cerro Metate/MO 0%)

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



T10(Copalcohuitl/cachaza 5%) T11(Copalcohuitl/Suelo Morelos 5%) T12(Copalcohuitl/MO 0%)



T13(Antiguas Vías/cachaza 5%) T14(Antiguas Vías/Suelo Morelos 5%) T15(*R. intraradices*/MO 0%)



T16(Tezontitla/5% cachaza) T17(Tezontitla/Suelo Morelos 5%) T18(Tezontitla/ M.O. 0%)

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



Figura 29. Pruebas de inhibición bacteriana después de 24 horas a una concentración del extracto de 60 mg mL⁻¹ de plantas provenientes con distinto tratamiento con HMA/MO. Los controles positivos solo con la bacteria se indican con la etiqueta Psph+ y presentan coloración amarillo fluorescente que indica crecimiento. El control negativo presenta la etiqueta Cloranfenicol-, donde se presenta transparencia no hubo crecimiento bacteriano. Los tratamientos con el extracto se indican con la etiqueta T.

El aumento en la concentración de metabolitos secundarios, conceptualmente se esperaría debido a la mejora en las condiciones nutricionales después de la inoculación con micorrizas. El aumento de la concentración de los compuestos bioactivos en las plantas inoculadas con hongos micorrízicos pudieron incrementarse debido a la inducción de sistema de defensa de las plantas (Araim *et al.*, 2009). Sin embargo, no todos los tratamientos inoculados con HMA incrementaron el compuesto bioactivo, además, estos tratamientos presentaron una colonización menor al 60%.

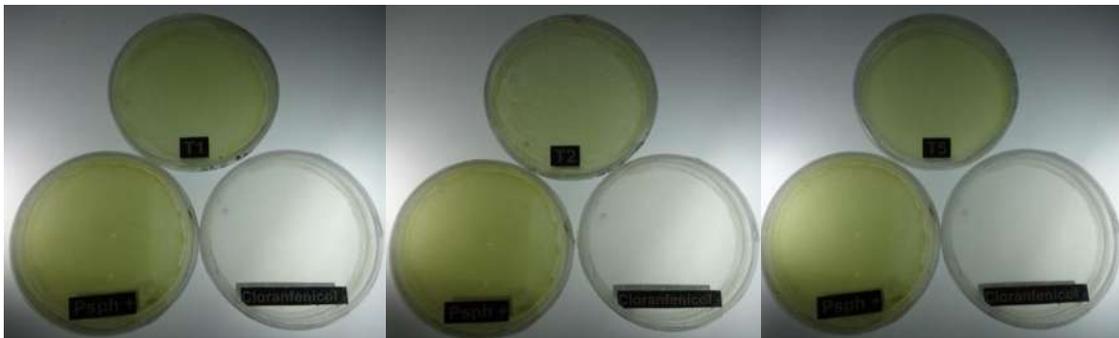
Este hecho puede estar relacionado, al efecto que tienen los HMA cuando colonizan las raíces. Mientras esto sucede, la planta produce metabolitos secundarios que regulan la fase de reconocimiento de los HMA, pero por otra parte, se pueden incrementar otros compuestos (Barrer, 2009), que en este caso, en plantas de algunos tratamientos pudo incrementarse el metabolito con efecto bactericida, o en otros casos, existen metabolitos que pueden estimular la colonización de algunas especies, como se presentó en un experimento donde el

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

metabolito secundario formononetina producido en papas, estimuló la colonización de *Gigaspora*, pero no de *Glomus* (Barrer, 2009), y también pudo estimular la colonización de alguna especie contenida en el inóculo del tratamiento que si incrementó el compuesto bactericida y que esta especie pueda tener afinidad con el axihuitl.

7.3.6 Pruebas de inhibición del crecimiento de *P. syringae* pv. *phaseolicola* a una concentración de extracto de axihuitl de 40 mg mL⁻¹ después de 24 horas.

Puesto que hubo tratamientos en el experimento anterior que inhibieron la bacteria completamente (T1, T2 y T11) a una concentración de 60 mg mL⁻¹, se realizaron otras pruebas microbiológicas, para conocer si estos tratamientos inhibirían el crecimiento de la bacteria con una menor concentración (Figura 30). Sin embargo con la concentración de 40 mg mL⁻¹, no se presentó un efecto inhibitorio de *P. syringae* pv. *phaseolicola*.



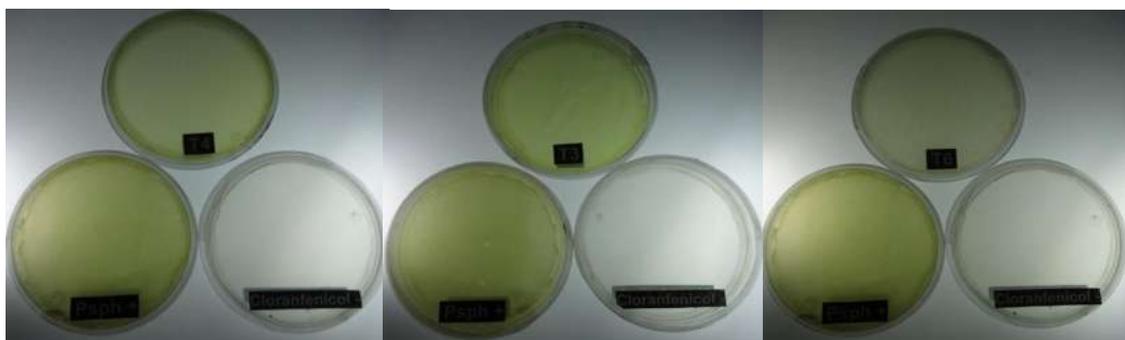
T1(*R.intraradices*/cachaza5%) T2(*R. intraradices*/Suelo Morelos) T5(Campesinas/Suelo Morelos)
5% 5%

Figura 30. Pruebas de inhibición bacteriana después de 24 horas a una concentración del extracto de 40 mg mL⁻¹ de plantas provenientes con distinto tratamiento con HMA/MO. Los controles positivos solo con la bacteria se indican con la etiqueta Psph+ y presentan coloración amarillo fluorescente que indica crecimiento. El control negativo presenta la etiqueta Cloranfenicol-, donde se presenta transparencia no hubo crecimiento bacteriano. Los tratamientos con el extracto se indican con la etiqueta T.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

7.3.7 Pruebas de inhibición del crecimiento de *P. syringae* pv. *phaseolicola* a una concentración de extracto de axihuitl de 80 mg mL⁻¹ después de 24 horas.

Puesto que hubo extractos que no presentaron un efecto bactericida con la concentración de 60 mg mL⁻¹, se realizaron pruebas con la concentración mínima inhibitoria de 80 mg mL⁻¹ de estos tratamientos, la cual fue aplicada por Godínez (2012) (Figura 31). En esta concentración, hubo inhibición de la bacteria con los tratamientos T14: Antiguas Vías con Suelo de Morelos al 5%; T17: Tezontitla con suelo de Morelos al 5%; T20: sin inóculo con suelo de Morelos al 5% y el tratamiento control T21: sin inóculo de HMA ni M.O. Las bacterias en las placas de los tratamientos T14 y T17 no presentaron un crecimiento uniforme en las cajas, sino que el crecimiento fue aislado como unidades formadoras de colonias de *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Este comportamiento pudo deberse a que estos tratamientos incrementaron en cierta medida los compuestos bioactivos, aunque no lo suficiente, manifestando solo efecto bacteriostático. Un ejemplo de este efecto inhibitorio se encontró en pruebas *in vitro*, con extractos de gel de *Aloe vera* aplicados a la bacteria *Listeria monocytogenes*, los cuales no lograron un efecto bactericida, puesto que la bacteria logró desarrollarse, pero finalmente, el crecimiento fue interferido (Ramírez *et al.*, 2012).

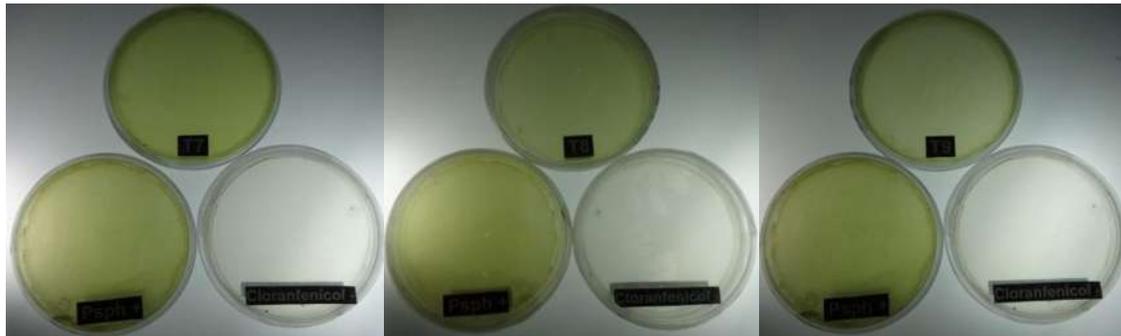


T3(R. intraradices/MO 0%)

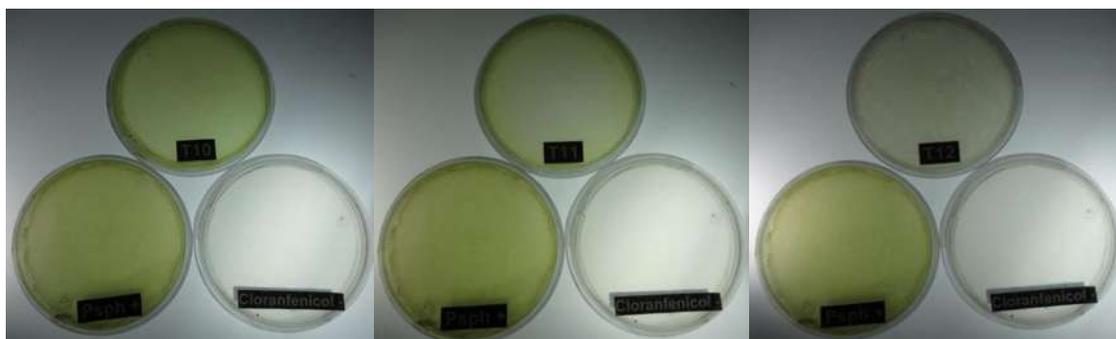
T4(Campesinas/cachaza 5%)

T6(Campesinas/MO 0%)

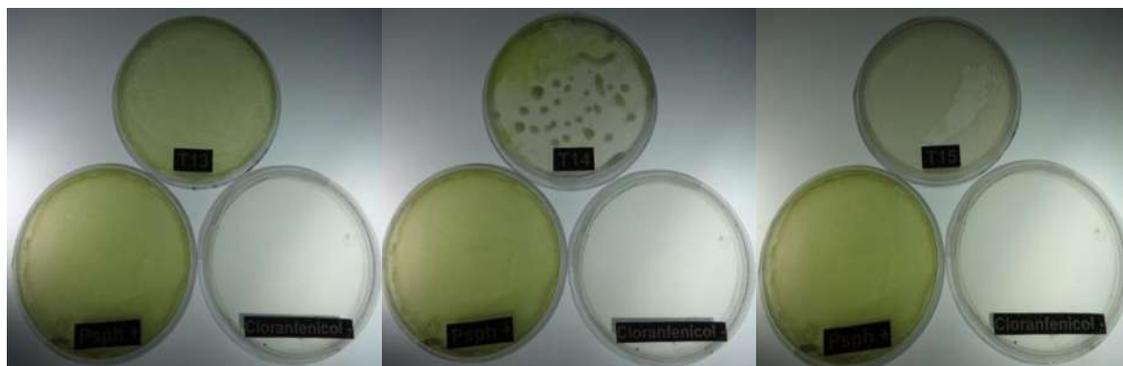
Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



T7(Cerro Metate/cachaza 5%) T8(Cerro Metate/Suelo Morelos 5%) T9 (Cerro Metate/MO 0%)

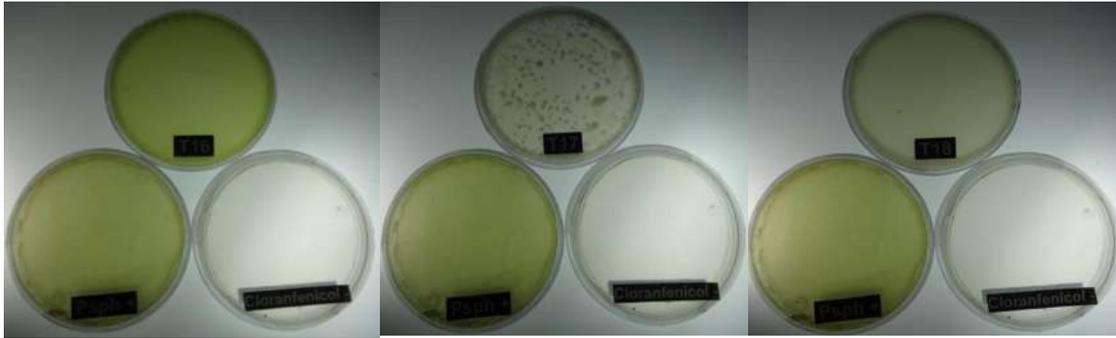


T10(Copalcohuitl/cachaza 5%) T11(Copalcohuitl/Suelo Morelos 5%) T12(Copalcohuitl/MO 0%)



T13(Antiguas Vías/cachaza 5%) T14(Antiguas Vías/Suelo Morelos 5%) T15(*R. intraradices*/MO 0%)

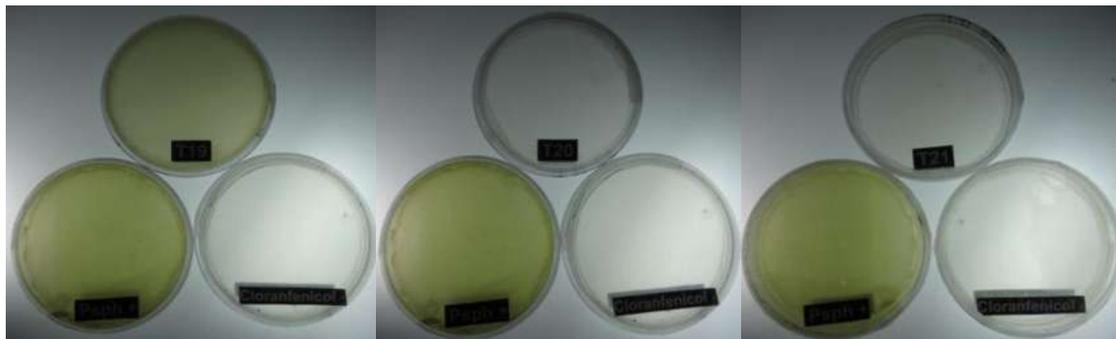
Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



T16(Tezontitla/cachaza 5%)

T17(Tezontitla/Suelo Morelos
5%)

T18(Tezontitla/MO 0%)



T19(Tezontitla/cachaza 5%)

T20(Tezontitla/Suelo Morelos
5%)

T21 (Tezontitla/MO 0%)

Figura 31. Pruebas de inhibición bacteriana después de 24 h a una concentración del extracto de 80 mg mL⁻¹ de plantas provenientes con distinto tratamiento con HMA/MO. Los controles positivos solo con la bacteria se indican con la etiqueta Psph+ y presentan coloración amarillo fosforescente que indica crecimiento. El control negativo presenta la etiqueta Cloranfenicol-, donde se presenta transparencia no hubo crecimiento bacteriano. Los tratamientos con el extracto se indican con la etiqueta T.

Puesto que los resultados mostraron que no hubo efecto bactericida, aun con la aplicación del extracto con la concentración mínima inhibitoria, pero si se presentó efecto bactericida en el tratamiento control, podría traducirse en que el incremento de la concentración de compuestos bactericidas fue por el porcentaje de materia

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

orgánica aplicada y no por el inóculo micorrízico y la asociación de HMA (Cuadro 17).

Cuadro 17. Resumen del efecto bactericida en tres diferentes concentraciones de extracto de axihuitl.

TRATAMIENTO	PRESENTÓ INHIBICIÓN BACTERIANA		
	[80 mg mL ⁻¹]	[60 mg mL ⁻¹]	[40 mg mL ⁻¹]
T1(<i>R. intraradices</i> /5% cachaza)	no	si	no
T2(<i>R. intraradices</i> / Suelo Morelos 5%)	no	si	no
T3 (<i>R. intraradices</i> /MO 0%)	no	no	no
T4 (Campesinas/cachaza 5%)	no	no	no
T5(Campesinas/ Suelo Morelos)	no	si	no
T6 (Campesinas/MO 0%)	no	no	no
T7 (Cerro Metate/cachaza 5%)	no	no	no
T8 (Cerro Metate/ Suelo Morelos 5%)	no	no	no
T9 (Cerro Metate/MO 0%)	no	no	no
T10 (Copalcohuitl/cachaza 5%)	no	no	no
T11 (Copalcohuitl/Suelo Morelos 5%)	no	no	no
T12 (Copalcohuitl/MO 0%)	no	no	no
T13 (Antiguas vías del tren/cachaza 5%)	no	no	no
T14 (Antiguas vías /Suelo Morelos 5%)	si	no	no
T15 (<i>R. intraradices</i> /MO 0%)	no	no	no
T16(Tezontitla/cachaza 5%)	no	no	no
T17 (Tezontitla/Suelo Morelos 5%)	si	no	no
T18 (<i>Tezontitla</i> /MO 0%)	no	no	no
T19 (Tezontitla/cachaza 5%)	no	no	no
T20 (Tezontitla/Suelo Morelos 5%)	si	no	no
T21 (Tezontitla/MO 0%)	si	no	no

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

7.3.8 *Análisis de correlación entre variables de crecimiento de axihuitl, inhibición de crecimiento bacteriano por extractos y presencia de HMA en las raíces de las plantas.*

El análisis de correlación del peso fresco y peso seco con respecto al porcentaje de colonización, presentaron una correlación positiva. Estos resultados fueron estadísticamente significativos, mostrando que a mayor porcentaje de colonización, mayor el incremento en la biomasa vegetal (Cuadro 18). Así mismo, los pesos frescos y secos de la parte aérea de la planta presentaron una correlación significativa en relación con la inhibición bacteriana. Mientras que la colonización micorrízica y la inhibición bacteriana no presentaron una correlación significativa.

Cuadro 18. Correlación de Spearman (r) entre las variables de peso fresco y seco aéreo, inhibición bacteriana y colonización micorrízica para plantas de axihuitl bajo condiciones de invernadero.

Variables	Peso seco (parte aérea)	Colonización	Inhibición bacteriana
Peso fresco (parte aérea)	0.8051 (P= 0.00)	0.2253 (P= 0.00)	0.4539 (P=0.00)
Peso seco (parte aérea)		0.2917 (P= 0.00)	0.4227 (P= 0.00)
Colonización micorrízica			0.0269 (P= 0.6986)

Valores-P abajo de 0.05 indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95.0%.

Estos resultados parecen apoyar el hecho de que el incremento por efecto de los HMA en la biomasa también presentó un efecto en la inhibición de la bacteria, sin embargo esto no se observó en todos los tratamientos, por lo cual, el incremento del compuesto bactericida pudiera estar más relacionado al efecto de alguna especie en particular de HMA contenida en los inóculos de los tratamientos aplicados a las placas donde si hubo inhibición.

VIII DISCUSIÓN GENERAL

Eupatorium aschbornianum, al ser una especie silvestre que requiere de condiciones específicas de nutrición en su medio natural, condujo a que se aplicara un porcentaje de materia orgánica, para mantener a la planta con los nutrimentos suficientes y que esta se pudiera establecer y mantener por cierto periodo, pero al parecer, este porcentaje, que fue del 5%, permitió que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) establecieran simbiosis con la planta de axihuitl. En cuanto al incremento de compuestos con efecto bactericida en el axihuitl, no fue por efecto específicamente de los HMA, ya que tratamientos sin inóculo donde se presentó incremento de compuestos bactericidas, sin embargo, se desconoce si se incrementó algún otro compuesto del metabolismo secundario, por efecto de los hongos micorrízicos. En general, estudios sobre la influencia de la materia orgánica (MO) de diferentes sustratos orgánicos, sobre los HMA, han presentado resultados contradictorios en cuanto a los resultados publicados, mostrando efectos diferentes en las plantas (Glynder *et al.*, 2009). Sin embargo, el sustrato puede ser clave en la efectividad de los HMA, ya que además de proporcionar nutrientes minerales a las plantas, puede modificar el pH y diferentes especies de micorrizas tienen diferentes óptimos para pH del suelo (Herrera *et al.*, 2011).

Así como se han detectado mayores concentraciones en los metabolitos secundarios debido a incrementos de estrés nutrimental, como en la planta *Senecio grisebachii*, donde la producción de metabolitos secundarios se incrementó, por falta de macronutrientes, cuando se redujo la disponibilidad de fósforo y de nitrógeno (Yaber *et al.*, 2009). También se han presentado incrementos donde, además de la aplicación de HMA, se adicionan nutrientes y se incrementan los metabolitos secundarios de importancia medicinal, un ejemplo fue la evaluación en una *Asteraceae* (*Equinacea purpurea*) especie medicinal con compuestos fenólicos y alcanidas (con propiedades antipatógenas), las cuales

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

fueron inoculadas con *Rhizophagus intraradices* y adicionados con solución nutritiva de Long Ashton (LANS), donde los resultados indicaron que el HMA aumentó la mayoría de los compuestos fenólicos, especialmente cinarina y cichorico, caftarico y los ácidos clorogénicos (Araim *et al.*, 2009). Pero también, se han encontrado el incremento de metabolitos secundarios en compuestos, secundarios con actividad antioxidante, como en el caso de compuestos polifenólicos en fresa, que se incrementaron haciendo una dosificación controlada de nutrientes, con niveles superiores de materia orgánica y niveles inferiores de nutrición mineral (Carvajal *et al.*, 2012).

Por otra parte la síntesis del metabolitos secundarios depende también de la edad y desarrollo de las plantas (Mafeei, 1989), así como se pueden sintetizar en una parte de la planta y concentrar en otra parte, como se observó con el metabolito secundario catarantina y vindolina de la planta *Catharanthus roseus*, donde estos compuestos aumentaron con la edad de la hoja. En las hojas 1 a 3 se estabilizaron y comenzaron a disminuir a partir de las hojas 4 a 9 (Roepke *et al.*, 2010), esta referencia se muestra debido a que los extractos se obtuvieron de la parte aérea de la planta, pero se desconoce si en la raíz se pudo incrementar el metabolito con efecto bactericida.

IX CONCLUSIONES

La materia orgánica fue el factor determinante para que las plantas de axihuitl sobrevivieran. Así mismo, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos con diferentes niveles y fuentes de materia orgánica.

Los tratamientos a los que se adicionó materia orgánica con porcentaje del 5% v/v, fueron los que presentaron un mayor incremento en la biomasa vegetal, siendo para el primer experimento: *Rhizophagus intraradices* con vermicomposta al 5% (T4), para el segundo experimento: Cerro del Metate con MO 5% y El Limón con MO 5% (T7) y para el tercer experimento: *R. intraradices* con composta al 5% (T1).

La colonización micorrízica se presentó en todos los tratamientos con adición de inóculos de HMA, presentando el mayor porcentaje de colonización micorrízica (PCM): *R. intraradices* con vermicomposta al 5% (T4), 26% de PCM; Las Campesinas con MO 5% (T10), 93% de PCM; Antiguas Vías del tren con composta al 5% (T13), 61% de PCM y Antiguas Vías del Tren con suelo de Morelos al 5% (T14), 60% de PCM, del primero, segundo y tercer experimento, respectivamente.

Los extractos que presentaron un incremento en la actividad bactericida fueron T2 (*R. intraradices* con composta al 2.5%), T4 (Cerro del Metate con composta al 5%) y T16 (sin inóculo de HMA con composta al 5%) del segundo experimento. T1 (*R. intraradices* con cachaza 5%), T2 (*R. intraradices* con suelo de Morelos 5%) y T5 (Campesinas con Suelo de Morelos 5%) del tercer experimento.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

X PERSPECTIVAS

Para futuros estudios que se lleven a cabo con extractos de axihuitl, se recomienda el uso de inóculos de HMA, para incrementar la biomasa vegetal de las plantas.

Se recomienda hacer pruebas bactericidas tomando en cuenta la raíz para la obtención de extractos.

Probar otras especies de HMA que tengan más tolerancia al incremento de nutrimentos debido a que el axihuitl requiere mucha materia orgánica, podría incrementar el compuesto bioactivo por efecto de los HMA.

Puesto que el axihuitl requiere muchos nutrimentos, se sugiere incrementar dosis de macro y micronutrientes, o usar fuentes ricas en nutrimentos para conocer el efecto en el incremento del compuesto bactericida.

XI BIBLIOGRAFÍA

Acharya S. 2013. **Control of the potato virus x through application of root extracts of *Chlorophytum nepalense* to potato plants and tubers.** *Potato Research*. 56, 1-10.

Agrios, G. N. 2005. **Plant pathology.** Elsevier Academic Press. United States of America. 5th edition. 922 pp.

Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. 2005. **Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi.** *Nature*. 435:824–827.

Alvarado C. J., Dasgupta S. N., Ambriz E., Sánchez Y. J. M., Villegas J. 2011. **Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo.** *Revista internacional de contaminación ambiental*. 27(4): 357-364.

Araim G., Saleem A., Arnason J. T., and Charest C. 2009. **Root colonization by an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of purple coneflores *Echinacea purpurea* (L.) Moench.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 2255–2258.

Arvizu G. J. L., Hernández M. A., Pacheco Aguilar., Álvarez M. A. 2013. **Transcriptional profile of *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 at low temperature: physiology of phytopathogenic bacteria.** *BMC Microbiology*, 13:81.

Arias Z. M., Angarita V. M. J., Aguirre C. A. M., Restrepo F. J. M., Montoya V. C. 2009. **Estrategias para incrementar producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales.** *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 62(1): 4881-4895.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

- Ávalos G. A., Pérez U. C. E. 2009. **Metabolismo secundario de plantas.** *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.* 2(3): 119-145.
- Barrer S.E. 2009. **Arbuscular mycorrhizal fungi as alternative to sustentable agriculture.** *Facultad de Ciencias Agropecuarias.* 7(1): 123-132.
- Baslam M., Esteban R., García P.J.I., Goicoechea N. 2013. **Effectiveness of arbuscular, mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of major carotenoids, chlorophylls and tocopherol in green and red leaf lettuces.** *Applied Microbial and Cel Physiology.* 97: 3119-3128.
- Bettiol W. 2006. **Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales.** *Fitosanidad.* 10 (2): 85-98.
- Boiteux J., Soto V. C., Pizzuolo P., Lucero G., Silva Ma. F. 2014. **Phenolic characterization and antimicrobial activity of folk medicinal plant extracts for their applications in olive production.** *Electrophoresis.* 35: 1709–1718.
- Camarena G. G. 2012. **Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares.** *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* 409-421.
- Carvajal M. J. S., Mera B. A. C. 2010. **Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible.** *Producción + Limpia.* 5 (2):77-96.
- Carvajal P. L. M., Haidi Y. E., Cartagena R., Peláez C., Gaviria C.A., Rojano B. A. 2012. **Capacidad antioxidante de dos variedades de *Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne (fresa) sometidas a variaciones en la nutrición vegetal.** *Cubana de Plant Med.* 17 (1): 37-56.
- Carrasco R. L. 2009. **Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas.** *Idesia (Chile).* 27 (3): 59-76.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

- Carreón A. Y., Gómez D. N., Martínez T. M. 2007. **Hongos micorrízicos arbusculares y su uso como fertilizantes**. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Fundación Produce de Michoacán A.C. 1ª ed. 87 pp.
- Cheema Z. A., Farooq M., Wahid A. 2013. **Allelopathy current trends and future applications**. Springer. 517 pp.
- Chirinos J. 2009. **Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas**. *INIA Divulga*. 14: 40-42.
- Cody Y., Gross D.C. 1987. **Characterization of pyoverdinin, the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae***. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 (5): 928-934.
- Contreras MacBeath.T., Boyás J.C., Jaramillo F. 2006. **La diversidad biológica en Morelos: estudio del Estado**. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO) y Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) México. 156 pp.
- Cuadros G. A., Gómez S.R., Rodríguez L.N.F. 2011. **Symbiotic association of arbuscular mycorrhizal fungi and the root system of cocoa (*Theobroma cacao* L.) seedlings: effect of formononetin and phosphorus availability at soil level**. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12 (1): 77-85.
- Daynes C. N., Field D. J., Saleeba J. A., Cole M. A., McGee P. A. 2013. **Development and stabilisation of soil structure via interactions between organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi and plant roots**. *Soil Biology & Biochemistry*. 57: 683-694.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axíhuítl 2015

- De la Rosa M. C.J. 2009. **Micorriza arbuscular y abiótica en el contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina) de *Catharanthus roseus* (L) G. Don.** [Tesis]. [Montecillo, Texcoco (Edo. de México)]. P 117.
- Díaz F.A., Salinas G. J. R., Espinoza S. F., Peña R. M. A., Garza R. F. R., Grageda C. O. A. 2014. **Características de planta, suelo y productividad entre sorgo fertilizado e inoculado con micorriza arbuscular.** *Revista mexicana de ciencias agrícolas.* 5 (3): 379-390.
- Falcón O. E., Riera N. M.C., Rodríguez L. O. 2013. **Efecto de la inoculación de hongos micorrizógenos sobre la producción de posturas forestales en dos tipos de suelo.** *Cultivos tropicales.* 34 (3): 32-39.
- Farfán S.B.M. 2010. **Efecto de la micorriza arbuscular en el contenido de compuestos volátiles de plantas de Nurite *Saureja macrostema* (Brenth) Briqu.** [Tesis] [Morelia (Michoacán)]: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. P 75.
- Fernández F. O., Carrillo G. R., Vangronsveld J., González C. M. C. 2008. **Arbuscular mycorrhizal fungi and Zn Accumulation in the metallophytic plant *Viola calaminaria* (Gingins.) Lej.** *Revista Chapingo. Serie horticultura.* 14:355–360.
- Flores C., Cuenca G. 2004. **Crecimiento y dependencia micorrízica de la especie pionera y polenectarífera *Oyedaea verbesinoides* (tara amarilla) Asteraceae.** *Interciencia.* 29 (11): 632-636.
- Gianinazzi P. V., Gianinazzi S, Guillemin J. P., Trouvelot A. and Duc G. 1991. **Genetic and cellular analysis fungi in pea mutants.** *Kluwer Academic Publishers Dordrecht/Boston.* 336-342.
- Glasby J. S. 2002. **Directory of plants containing secondary metabolites.** CCR Press. 1644 pp.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

- Glynder M., Hrselová H., Tomás Cajthaml T., Havránková M., Veronika Rezacová V., Gryndlerová H., y Larsen J. 2009. **Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization.** *Mycorrhiza*. 19: 255-266.
- Godínez V. A. M. 2012. **Efecto antimicrobiano in vitro de extractos de *Eupatorium aschembornianum* sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.** [Tesis]. [Guadalajara (Jalisco)]: Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. 98 pp.
- González A. J., Ordax M. y Mendoza Ma. C. 2002. **Evaluación de los iniciadores del método BIO-PCR sobre aislamientos fitopatógenos de *Pseudomonas* aisladas de judía común.** *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*. 28: 51-58.
- Harris V. C., Esqueda M., Valenzuela S. E. M. y Castellanos A. E. 2009. **Water stress tolerance in plant-arbuscular mycorrhizal fungi interaction: energy metabolism and physiology.** *Revista fitotecnia mexicana*. 32 (4): 265-271.
- Herrera P. R. A., Hamel C., Fernández F., Ferrer R. L. & Furrázola E. 2011. **Soil-strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants?.** *Mycorrhiza*. 21: 183-193.
- Hobbie E. A. and Högberg P. 2012. **Nitrogen isotopes link mycorrhizal fungi and plants to nitrogen dynamics.** *New Phytologist*. 196: 367-382.
- Hodge A. 2003. **Plant nitrogen capture from organic matter as affected by spatial dispersion, interspecific competition and mycorrhizal colonization.** *New Phytologist*. 157: 303-314.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axíhuítl 2015

- Hounsone N. B., Hounsone D. T. y Jones E. G., 2008. **Plant metabolites and nutritional quality of vegetables.** *Journal of Food Science.* 73: 48-65.
- Joner E., Briones R. & Leyval C. 2000. **Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium.** *Plant and Soil.* 226: 227–234.
- Julca O. A., Meneses F. L., Blass S. R., Bello A. S. 2006. **La materia orgánica, su importancia y experiencias de su uso en la agricultura.** *IDESIA.* 24 (1): 49-61.
- Karlovsky P. 2008. **Secondary Metabolites in Soil Ecology.** *Springer.* 293 pp.
- Koltai H., y Kapulnik Y. 2010. **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function.** *Springer.* 2nd edition. 323 pp.
- Lata H., Andrade D. Z., Schanebery B., Bedir E., Khan I., y Moraes R. 2003. **Arbuscular mycorrhizal inoculation enhances survival rates and growth of micro propagated plantlets of *Echinacea pallida*.** *Planta Medica.* 69, 679-682.
- Lewinsohn E., Gijzen, 2009. **Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism.** *Plant Science.* 176: 161-169.
- Leyva E., Navarro T. G., Loredó C. S. E., María del Socorro Santos D. M. S. 2011. **Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides.** *Boletín de la Sociedad Química de México.* 5(2): 35-43.
- Li Z.M., Wua M., Jian Z.J., Irwinc D., Cheng G.Y., Wen S.Q. 2008. **Review chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium*.** *Chemistry & Biodiversity.* 5: 40-55.
- Lingua G., Bona E., Manassero P., Marsano F., Todeschini V. Cantamessa S., Copetta A., D'Agostino G., Gamalero E., Maffei M. G. B., Chialva F y Sacco T. 2013. **Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting**

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

- Pseudomonas* increases anthocyanin concentration in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* var. Selva) in conditions of reduced fertilization.** *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 16207-16225.
- Maffei M., Chialva F.& Sacco T. 1989. **Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves.** *New Phytologist*. 111: 707-716.
- Manjarrez M. M. J., Ferrera C.R., González C.M.C., 1999. **Efecto de la vermicomposta y la micorriza arbuscular en el desarrollo y tasa fotosintética de chile serrano.** *Terra*. 17: 1.
- Martínez G. L. B., García K., Hammer E. C. y Vayssieres A. 2013. **Mycorrhiza for all: an under-earth.** *New Phytologist*. 198: 652-655.
- McGonigle T., Miller M., Evans D., Fairchild G., Swan J. 1990. **A new method wich gives and objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi.** *New Phytologist* 115: 495-501.
- Mena C.J., Velázquez R.V. 2010. **Manejo integrado de plagas y enfermedades de frijol en Zacatecas.** Folleto Técnico No. 24. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. 83 pp.
- Miransari M. 2011. **Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake.** *Arch Microbiol*. 193: 77-81.
- Molina M. J. R., Salvador F.M., Montes M. A. A., Álvarez S.J.D., Gutiérrez M. F. A. 2012. **Efecto de la vermicomposta sobre el crecimiento de *Ardisia escallonioides* y producción de metabolitos secundarios.** *Gayana Bot*. 69 (Número Especial): 82-88.
- Montaño N. M., Alarcón A., Camargo R. S.L., Hernández C. L.V. Álvarez S.J., González C. M. C. A., Gavito M.E., Sánchez G. I., Ramos Z.J., Guadarrama P., Maldonado M. I. E., Castillo A. S., Trejo D., García S.R., Ferrera C.R. 2012. **Research on arbuscular mycorrhizae in México: an**

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

historical synthesis and future prospects. *Symbiosis*. DOI 10.1007/s13199-012-0184-0

Moot K. A., Takemoto J. Y. 1989. **Syringomycin, a bacterial phytotoxin, closes stomata.** *Plant Physiol.* 90:1435-1439.

Mukerji K. G., Chamola B. P., y Singh J. 2000. *Mycorrhizal Biology.* **Kluw Academic /Plenum Publishers.** New York, U.S.A. 329 pp.

Oliveira M. S., Campos M. A. S., and Silva F. S. B. 2014. **Arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost to maximize the production of foliar biomolecules in *Passiflora alata* Curtis seedlings.** *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 95: 522–528.

Orujeia Y., Shabanib L., and Sharifi T. M. 2013. **Induction of glycyrrhizin and total phenolic compound production in licorice by using arbuscular mycorrhizal fungi.** *Russian Journal of Plant Physiology.* 60 (6): 855-860.

Pasini C., D'Aquila F; Curir P., Gullino M. L. 1997. **Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) in glasshouses.** *Crop Protection.* 16:251-256.

Pedone B.M.V.L., Lins M.A., Coehlo L.R., Santana S.A., Silva F.S.B., Maia L.C. 2012. **Mycorrhizal technology and phosphorus in the production of primary and secondary metabolites in cebil (*Anadenanthera colubrine* (Vell.) Brenan) seedlings.** *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 93: 1479-1484.

Pérez A. N., y Jiménez E. 2011. **Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*.** *Biotecnología Vegetal.* 11 (4): 195-211.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

- Porcel R., Aroca R. & Ruiz L. J. M.I. 2012. **Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal.** *Agronomy for Sustainable Developmen.* 32: 181-200.
- Prado M. C. C. 2012. **Efecto inhibitorio *in vitro* de extractos de *Eupatorium aschembornianum* sobre *Erwina chrysantemi* agente causal de pudrición blanda en plantas.** [Tesis]. [Guadalajara (Jalisco)]: Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. 98 pp.
- Prudencio S.J.M., Navarrete M.R., Navarrete M.J., Acosta G.J. 2008. **Dynamics of common and halo blights in the Valley of Mexico.** *Agricultura Técnica en México.* 34: 201-212.
- Quiñones A. E. E., Hernández A. E., Rincón E. G., Ferrera C. R. 2012. **Interacción de hongos micorrízicos arbusculares y fertilización fosfatada en papaya.** *Terra Latinoamericana.* 30 (2): 165-172.
- Radhika K. P. & Rodrigues B. F. 2011. **Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on andrographolide concentration in *Andrographis paniculata*.** *Australian Journal of Medical Herbalism.* 23 (1): 34-39.
- Ramírez M. L. G., Marón de Salim A., Catinella R., Castillo L. 2012. **Efecto bacteriostático y/o bactericida de extractos de gel de *Aloe vera* sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*.** *Archivos Latinoamericanos de nutrición.* 62 (1): 72-78.
- Rapparini F., Llusia J., Peñuelas L. 2007. **Effecto of arbuscular mycorrhizal (AM) colonization on terpene emission and content of *Artemisa annua* L.** *Plant biology.* 10: 108-122.
- Redecker D., Schübler A., Stockinger H., Stürmer S., Morton J., and Walker C. 2013. **An evidence-based consensus for the classification of**

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

- arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*. 24: 301-314.
- Reyes T. A. 2015. **Actinomicetos y hongos micorrízicos arbusculares como agentes de control biológico de la marchitez del chila.**[Tesis]. [Morelia (Michoacán)]: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. 160 pp.
- Reyes T. A. 2012. **Variación estacional de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) asociados al agave mezcalero (*Agave cupreata* Trel & Berger en Michoacán.** [Tesis]. [Morelia (Michoacán)]: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 78 pp.
- Rincón G., Quiñones A.E.E. 2010. **Uso del “axihuitl”, una planta mexicana, en tecnologías de control biológico de enfermedades de plan.** *Hypatia - Revista de Divulgación Científico - Tecnológica del Estado de Morelos*. [Internet]. [Consultado el 3 de diciembre de 2012]. Revista no. 35. Disponible:http://hypatia.morelos.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=616&Itemid=551
- Rodríguez Y.Y., De la Noval P.B., Fernández M.F., Rodríguez H.P. 2004. **Comparative study of behavior of six arbuscular mycorrhizal fungi when colonize tomato plants (*Lycopersicon esculentum* M. var “Amalia”).** *Ecología Aplicada*. 3(1,2): 162-171.
- Roepke J., Salim V., Wu M., Thamm A. M. K., Murata J., Ploss K., Boland W., and De Luca V. 2010. **Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (34): 15287-15292.
- Rogozhina E. A., I. I. Tepkeeva I. I., Zaitsevb D.V., Demushkina V.P.& Smirnovb A.N. 2011. **Biological activity of peptide extracts of medicinal plants against.** *Russian Agricultural Sciences* 37 (4): 314-317.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

- Rosales F.E., Trión S.C., Cerna J. 1998. **Producción de banano orgánico. Memorias del taller internacional EARTH.** INIBAP. Guácimo, Costa Rica. 265 pp.
- SAGARPA. 2010. **Uso de fertilizantes. Sistema de agronegocios agrícolas.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. No.12. 11pp.
- Sánchez M. M. E., Reyes T. B., Sánchez G. P., Rodríguez S. J., Castillo H. C., Cervantes C. H., Arrieta J. 2009. **Biossay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschembornianum*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls.** *Fitoterapia*. Doi: 10.1016/j.fitote.2009.07.009
- Satish S., Raveesha K. A. and Janardana G.R. 1999. **Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars.** *Letters in Applied Microbiology*. 28: 145-147.
- Sbrana C., Luciano A., Giovannetti M. 2014. **Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals.** *Electrophoresis*. 35: 1535-1546.
- Sepúlveda J. G., Porta D. E. y Rocha S. M. 2004. **La Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas.** *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21 (3): 355-363.
- Shrestha V. G., Shrestha K., Khadge B. R., Johnson N. C., Wallander Hakan. 2007. **Organic matter stimulates bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in *Bauhinia purpurea* and *Leucaena diversifolia* plantations on roded slopes in Nepal.** *Restoration Ecology*. 16 (1): 79-87.
- Siddiqui Z. A., Akhtar M. S., Futar K. 2008. **Mycorrhizae sustainable agriculture and forestry.** *Springer Science*. 350 pp.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axíhuítl 2015

- Simon L., Bousquet J., Levesque R.C. and Lalonde M. 1993. **Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants.** *Nature*. 363: 67-49
- Slabu C., Zörb C., Steffens d., Schubert S. 2009. **Is salt stress of faba bean (*Vicia faba*) caused by Na⁺ or Cl⁻ toxicity?.** *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*.172: 644–650.
- Smith S. E. y D. J. Read. 1997. **Mycorrhizal Symbiosis.** Academic Press. San Diego, U.S.A. 2nd ed. 589 pp.
- Smith S. E. y D. J. Read. 2008. **Mycorrhizal Symbiosis.** Academic Press. San Diego, U.S.A. 787 pp.
- Torres V. I. E. 2014. **Efecto de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento de plantas de leucaena y guayaba en invernadero.** [Tesis]. [Morelia (Michoacán)]: Instituto Tecnológico del Valle de Morelia. 111 pp.
- Trejo D., Ferrera C. R., García R., Varela L., Lara L., Alarcón A. 2011. **Effectiveness of native arbuscular mycorrhizal fungi consortia on coffee plants under greenhouse and field conditions.** *Revista Chilena de Historia Natural*. 84: 23-31.
- Van der Heijden M.G.A., Sanders I.R.S. 2003. **Mycorrhizal ecology.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Printed in Germany. 2nd printing. 52 pp.
- Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., and Pieterse C. M. J. 1998. **Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria.** *Annual Review of Phytopathology*. 36: 453-483.
- Vindas R., Ortiz F., Ramírez V., Cuenca P. 2004. **Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica.** *Revista de Biología Tropical*. 52 (3): 601-609.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

- Yaber G. M., Ciancia M. & Leicach S.R. 2009. **Variación en la producción de alcaloides en inflorescencias de *Senecio grisebachii* por deficiencia de nutrientes.** *Ciencia del suelo.* 27 (1): 31-39.
- Yadab K., Aggarwala A., Singh N. 2013. **Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced acclimatization, growth enhancement and colchicine content of micropropagated *Gloriosa superba* L. plantlets.** *Industrial Crops and Products.* 45: 88-93.
- Young J.M., Allen C., Countinho T., Denny T., Elphinstone J., Fegan M., Gillins M., Gottward T.R., Graham J.H., Iaconbellis N.S., Jense J.D., Jacques M.A., López M.M., Morris C.E., Parkinson., Prior P., Prucost P., Rodriguez N.J., Scortichini M., Takikawa Y., Upper C.D. 2008. **Plant-pathogenic bacteria as biological weapons – real threats?.** *Phytopathology.* 98: 1060-1065.
- Yuan Z., Dai C., Chen L. 2007. **Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system.** *Afr J Biotechnol.* 6: 1266-1271.
- Zeng Y., Ping G.L., Dong C.B., Peng H.Z., Yong W.J., Qui H.L., Yang G., Ming C.X., Yang L., Xiang W.Z., Lan C.M., Yan Z. 2013. **Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and prospectives.** *Mycorrhiza.* 23: 253-265.
- Zérega L. 1993. **Manejo y uso agronómico de la cachaza en suelos cañameleros.** *Caña de Azúcar.* 11 (2): 71-92.
- Zubek S., Rola K., Szewczyk A., Majewska M. L., Turnau K. 2015. **Enhanced concentrations of elements and secondary metabolites in *Viola tricolor* L. induced by arbuscular mycorrhizal fungi.** *Plant Soil.* 390:129–142.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

Zubek S., Stojakowska A., Anielska T., Turnau K. 2010. **Arbuscular mycorrhizal fungi alter thymol derivative contents of *Inula ensifolia* L.** *Mycorrhiza*. 20, 497–504.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

XII ANEXOS

12.1. Análisis fisicoquímico de la arena realizado por Servicios Analíticos Agroindustriales (SEANA).

Reporte de análisis de arena.

Numero de muestra	OT-157	M - 02
Propietario	Proyecto	ATENCIÓN
Localización	UMSNH-CIATEJ	Dr. Luis López P.
Mpio. Estado		
Clave del predio	Arena esterilizada	Fecha de muestreo
Cultivo	Papaya	Septiembre 2012

Análisis físico.

% Arcilla	% Limo	% Arena	Clasificación	Interpretación	
11.68	11	77.32	Arena migajosa	Textura gruesa	
C. Campo	PPM	H. Aprov.	L. Riego cm	Porosidad %	
11.73	5.78	5.96	4.7	38	
Color en seco		Color en humedad		D. Real g/cm ³	D. Apar. g/cm ³
Café grisáceo claro		Café		0.99	1.55

Análisis químico.

pH (agua)	pH (sol)	CE	Mat. Org.	N. Org.	N. Amon.
		ds/m	%	Kg/Ha	Ppm
7.0	6.63	0.288	1.10	8	5
Neutro	Lig. ácido	No salino	Muy bajo	Bajo	Bajo
Fósforo	Potasio	Calcio	Margnesio	Carbonatos	N. Mineral
ppm	ppm	ppm	ppm	%	Ppm
13	38	218	147	5.33	5
Kg/Ha	Kg/Ha	Kg/Ha	Kg/Ha	ppm	Kg/Ha
29	85	488	330	53300	11
Muy bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Muy bajo
Cloruros ppm	Hierro ppm	Azufre ppm	Cobre ppm	Manganeso ppm	Aluminio ppm
3	5	7.5	0	5	5

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

12.2. Ficha técnica de la composta

La composta elaborada a base de cachaza que es un subproducto de la industria azucarera y que se obtiene de ingenios de Tacámbaro, está compuesta fundamentalmente por: fibra de caña, hemicelulosa, celulosa, lignina, cera, coloides, coagulados, sustancias albuminoides, fosfatos de calcio, silicatos, óxidos de calcio, aminoácidos, proteínas, sacarosa, entre otros.

MUESTRA	Composta C-03
PROPIETARIO	Biotecnologías Agrop. De Madero
LOCALIZACIÓN	Madero
MPIO. ESTADO.	Madero
FECHA DE MUESTREO	12 de octubre de 2012

Análisis físico

Estado físico	Sólido
Color	gris

Análisis Químico

pH (agua)	7.5
CE (dS/m)	3.6
N. AMON. (ppm)	10
N. NITRI. (ppm)	8.5
FOSFORO (ppm)	147
POTASIO (ppm)	933
CALCIO (ppm)	27
MAGNESIO (ppm)	17

La composta presenta beneficios que al adicionarse al suelo como mejorar las propiedades físicas del suelo, favoreciendo la estabilidad de la estructura de los agregados del suelo, reduce la densidad aparente, aumenta la porosidad y permeabilidad y aumenta su capacidad de retención de agua en el suelo. La composta permite suelos más esponjosos que retienen una mayor cantidad de agua. También aumenta la capacidad de intercambio catiónico (C.I.C) que es la capacidad de retener nutrientes para luego liberarlos para los cultivos. Biológicamente actúa como soporte y alimento de los microorganismos ya que estos viven a expensas del humus, que es la materia orgánica descompuesta.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

12.3. Ficha técnica de la vermicomposta.

Materia orgánica	70.57%
Nitrógeno total	4.00%
Fósforo	2.96%
Potasio	444.18 PPM
pH	7.12
Alto en ácidos húmicos y fúlvicos	
Micronutrientes	Hierro-zinc-boro

12.4. Trabajos presentados



EFFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA) EN EL CRECIMIENTO DEL AXIHUITL (*Eupatorium aschembornianum*)

Susana García Téllez^{*1}, Gabriel Rincón Enríquez², Evangelina Quiñónez Aguilar² y Luis López Pérez¹

¹ UMSNH. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales.

² Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Correo. * meyahue@hotmail.com

El axihuitl (*Eupatorium aschembornianum*) es una planta herbácea nativa del estado de Morelos, de uso medicinal y es comúnmente usada para tratar problemas de úlceras estomacales, gastritis y heridas en la piel. Recientemente se han hecho estudios sobre las propiedades bactericidas que posee la planta, contra *Pseudomonas psiringae pv. phaseolicola* (agente causal del tizón del halo en frijol), y *Erwinia crisanthemi* (agente causal de la pudrición blanda en nardo). El axihuitl crece en lugares ricos en materia orgánica y es una planta que puede ser colonizada por hongos micorrizicos arbusculares (HMA). Al respecto, los HMA son simbiontes obligados que se asocian a las raíces de las plantas, pero se desconoce el efecto de la materia orgánica del suelo en el porcentaje de colonización y en el crecimiento de la planta de axihuitl. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de dos niveles de materia orgánica (sin y con vermicomposta- al 5% v/v en el sustrato) y hongos micorrizicos arbusculares (sin y con *Rhizophagus intraradices*- 80 esporas), en el establecimiento y crecimiento del axihuitl en condiciones de invernadero. Se generaron cuatro tratamientos repetidos cuatro veces con un total de 16 unidades experimentales distribuidas en un diseño completamente al azar. Se germinaron semillas de axihuitl en arena esterilizada y a los dos meses se inocularon las raíces con las esporas de los HMA y trasplantaron a bolsas de plástico de 1 kg, utilizando arena esterilizada como medio de crecimiento. Cada 15 días después del trasplante (ddt) y durante 6 meses se midieron variables de crecimiento como altura de la planta, diámetro de tallo y número de hojas. A los 180 ddt, se hizo un muestreo destructivo donde se evaluó el peso fresco y seco de la parte aérea y raíz, área foliar y se determinó el porcentaje de colonización micorrizica de cada tratamiento. Los resultados mostraron que las plantas de los tratamientos que no tuvieron materia orgánica murieron, estuvieran o no micorrizadas. Mientras que en los tratamientos con materia orgánica, las plantas pudieron establecerse y crecer, aunque no hubo diferencias significativas en las variables de crecimiento evaluadas entre plantas micorrizadas y sin HMA. En promedio obtuvieron 14.3 g (peso seco total) y 127.8 cm² de área foliar. En cuanto a colonización de HMA en las raíces se obtuvo un porcentaje del 26%. Como conclusión se puede decir que, las plantas de axihuitl requieren de materia orgánica en el sustrato para su establecimiento y crecimiento independientemente si estén o no micorrizadas. El relativo bajo porcentaje de la colonización micorrizica pudo haber sido debido al efecto de la vermicomposta, pues se ha visto que en otras plantas medicinales pueden presentarse porcentajes mayores al 60%.

**XXV Congreso Nacional y V
Internacional de Fitogenética**



**La Universidad Autónoma de San Luis Potosí
la Facultad de Agronomía y Veterinaria
y la Sociedad Mexicana de Fitogenética**

otorgan el presente
RECONOCIMIENTO

**A: Susana García Téllez, Gabriel Rincón Enríquez, Evangelina Quiñónez Aguilar, Luis
López Pérez**

Por haber presentado la **PONENCIA:**

**EFFECTO DE LA MATERIA ORGÁNICA Y HONGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES (HMA) EN EL CRECIMIENTO DEL AXIHUITL (*Eupatorium
aschembornianum*)**


Dr. José Luis Lara Mireles
Director de la Facultad


Dr. Ramon Garza García
Presidente de la SOMEFI

San Luis Potosí, SLP, MEXICO.
29 de septiembre al 3 de octubre de 2014.

INFLUENCIA DE LA MATERIA ORGÁNICA Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (HMA) EN EL CRECIMIENTO DEL AXIHUITL (*Eupatorium aschembornianum*)

Susana García Téllez¹, Gabriel Rincón Enríquez², Evangelina E. Quiñones Aguilar², Sylvia Fernández Pavía¹, Nuria Gómez Dorantes¹, Luis López Pérez¹.

Resumen

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos que se asocian de manera simbiote a las raíces de las plantas, propiciándoles una mejor nutrición, tolerancia a estreses abióticos (hídrico, salino) y bióticos (protección contra patógenos). Además como consecuencia de su colonización pueden incrementar la concentración de metabolitos secundarios en las plantas. Los aislados de HMA de ecosistemas naturales en México, constituyen una fuente importante de germoplasma nativo de HMA. Este puede ser utilizado como bioinoculantes promotores del crecimiento vegetal para ser aplicados en la producción de cultivos. El axihuitl, es una planta herbácea nativa de Morelos, que es utilizada por los lugareños de la región como remedio natural contra diferentes enfermedades. Se ha encontrado que esta planta posee metabolitos secundarios que tienen propiedades bactericidas. Por otro lado, el axihuitl es una planta que crece y se desarrolla en suelos ricos en materia orgánica (M.O.). Por lo anterior este trabajo tuvo como objetivo, evaluar el efecto de diferentes niveles de materia orgánica (0%, 2.5% y 5%), e inóculos de HMA, un inóculo comercial (*Rhizophagus intraradices*), consorcios nativos de HMA y sin HMA, en el crecimiento de plantas de axihuitl. El experimento se llevó a cabo en invernadero, con un diseño experimental completamente al azar, con 18 tratamientos, repetido 6 veces. Se midieron mensualmente variables de crecimiento como longitud de tallo, diámetro de tallo y número de hojas y al final del experimento la biomasa total y área foliar. Los resultados mostraron que los tratamientos que obtuvieron mayor longitud de tallo fueron los consorcios Cerro del Metate con 5% de M.O. (119.5 mm) y El Limón con 2.5% de M.O. (117.1 mm). En cuanto a diámetro de tallo (3.6 mm) y número de hojas (8) el consorcio Las Campesinas con 2.5% de M.O., obtuvo los mayores valores.

Palabras clave: composta, consorcios nativos, inóculo, biomasa total.

Introducción

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) del phylum Glomeromycota (Smith y Read, 2008) son microorganismos que se asocian de forma mutualista con las plantas. En esta asociación, el hongo le proporcionan a la planta una mejora en la absorción de

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH., Michoacán. meyahue@hotmail.com, fpavia@umich.mx, nuriah@live.com.mx, lexquillax@yahoo.com.mx.

²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. grincone@gmail.com, eqaguilar08@gmail.com

agua y nutrientes, y el hongo recibe fotosintatos de la planta (Van der Heijden y Sanders, 2003). Los HMA, también proveen otros beneficios a las plantas como, adaptación a suelos contaminados (Fernández *et al.*, 2008), protección contra patógenos (Smith y Read, 2008), y como consecuencia del proceso de colonización, se pueden incrementar los metabolitos secundarios presentes en algunas plantas (Pedone *et al.*, 2012). Algunas de las funciones de estos metabolitos son como atrayentes de insectos para la polinización, defensa contra herbívoros o plagas, entre otras. Así mismo, estos metabolitos tienen usos de tipo medicinal, industrial y alimenticio (Zeng *et al.*, 2013; Baslam *et al.*, 2013). Recientemente, se conoció que el axihuitl (planta silvestre de la familia Asteraceae, originaria del estado de Morelos), es utilizada comúnmente para tratar síntomas de gastritis, úlceras y heridas en la piel (Rincón y Quiñones, 2010). Además algunos de los metabolitos de esta planta tienen un efecto bactericida sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, bacteria que ataca al cultivo del frijol (enfermedad conocida como tizón del halo) (Godínez, 2012). El axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.), es una planta que se desarrolla normalmente en suelos ricos en materia orgánica y poco se conoce sobre la asociación micorrízica de esta planta y de la influencia de los HMA en su crecimiento.

Objetivo

Evaluar el efecto de tres niveles de materia orgánica y cinco inóculos de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento del axihuitl.

Materiales y métodos

Las plantas de axihuitl utilizadas en este experimento se obtuvieron a partir de semillas (colectadas en Tepoztlán, Morelos) que se germinaron en charolas de aluminio con un sustrato esterilizado consistente en una mezcla de arena y vermicomposta (5% v/v). Se establecieron los diferentes tratamientos en bolsas negras para vivero de un kilogramo, con sustrato consistente de arena con tres niveles de materia orgánica (0%, 2.5% y 5% v/v de composta) perfectamente mezclado. Cuando las plántulas tuvieron dos hojas verdaderas, se trasplantaron a las macetas y al mismo tiempo, se adicionaron los diferentes inóculos (80 esporas) Cerro del Metate (Tzitzio, Mich.), El Limón (Tumbisca, Mpio. de Morelia), Las Campesinas (Mpio. de Madero, Mich.), Copalcohuatl (San Juan Tlacotenco, Morelos), un inóculo mono-específico comercial a base de *Rhizophagus intraradices* y sin HMA. El experimento tuvo 18 tratamientos con seis repeticiones, con un arreglo completamente al azar y se mantuvo bajo condiciones de invernadero durante seis meses. Cada dos días se regaron las plantas con agua desionizada a capacidad de campo. Cada 30 días a partir del establecimiento, se midieron variables de crecimiento de las plantas como altura, diámetro del tallo y número de hojas. A los 180 días se realizó un muestreo destructivo, donde se midió la biomasa, fresca y seca por órgano, volumen radicular y área foliar. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía y cuando se encontró diferencia significativa entre tratamientos se realizó una prueba de comparación de medias Tukey ($P < 0.05$), utilizando el software STATGRAPHICS centurión.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axíhuítl 2015

Resultados

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Los tratamientos con M.O. presentaron valores más altos de las variables de crecimiento independientemente del inóculo utilizado (Tabla 1). Las plantas inoculadas con el consorcio Cerro de Metate y con 5% de M.O. en el sustrato presentaron la mayor altura, biomasa fresca total y volumen de raíz, respecto a los demás tratamientos. Las plantas con el inóculo El Limón y con 2.5% de M.O. presentaron la mayor longitud de raíz. Las plantas inoculadas con el consorcio Las Campesinas presentaron un tallo más grueso y una mayor cantidad de hojas. Respecto al área foliar, las plantas con inóculo Las Campesinas y con materia orgánica al 5% mostraron los valores más altos.

Tabla 1. Variables de crecimiento registradas a los 180 días después del establecimiento.

Inóculo de HMA	Sustrato	Altura	Diámetro	No.	Biomasa	Área	Volumen	Longitud
		mm	mm	Hojas	fresca g	foliar	de raíz	de raíz
						cm ²	mL	cm
	A	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
<i>Rhizophagus intraradices</i>	A/M.O 2.5	34.1 ab	0.9 ab	1.6 ab	0.41 a	10.96 ab	0.21 a	13.33 bc
	A/M.O 5	91 ab	2.2 ab	5 ab	3.30 ab	28.99 ab	0.74 ab	22 bc
	A	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Cerro del Metate	A/M.O 2.5	95.3 ab	2.9ab	3.6 ab	1.47 a	14.82 ab	0.33 a	22.78 bc
	A/M.O 5	119.5 b	2.9 ab	6.3 ab	7.10 b	53.22 b	1.51 b	30.85 bc
	A	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Limón	A/M.O 2.5	117.1 b	2.3 ab	6.3 ab	3.53 ab	46.25 b	0.78 ab	34.68 c
	A/M.O 5	95 ab	2.2 ab	5.2 ab	4.43 ab	55.44 b	0.86 ab	22.15 bc
	A	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Campesinas	A/M.O 2.5	113.5 ab	3.3 b	8 b	4.05 ab	33.07 b	0.9 ab	32.85 bc
	Arena/M.O 5	104.8 ab	2.8 ab	6 ab	3.50 ab	59.40 b	0.98 ab	21.81 bc
	A	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Copalcohuítl	A/M.O 2.5	23.33 ab	0.91 ab	1.3 ab	0.27 a	1.37 a	0.16 a	15.08 bc
	A/M.O 5	112.1 ab	2.0 ab	4.5 ab	3.11 ab	26.36 ab	0.81 ab	26.55 bc
	A	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Sin HMA	A/M.O 2.5	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
	A/M.O 5	104.1 ab	2.4 ab	5 ab	2.6 ab	16.51 ab	0.71 ab	30.5 bc

A (arena), M.O. 2.5 (materia orgánica al 2.5%), M.O. 5 (materia orgánica al 5%). Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ($P < 0.05$).

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015

En cuanto al tratamiento que presentó mayor biomasa seca total, fue el que tuvo como inóculo Cerro del metate con el 5% de materia orgánica con 2.52 g; sin embargo, resultó ser estadísticamente similar a los tratamientos 1, 7 8 10,11,13 15 y 16 (Fig. 2).

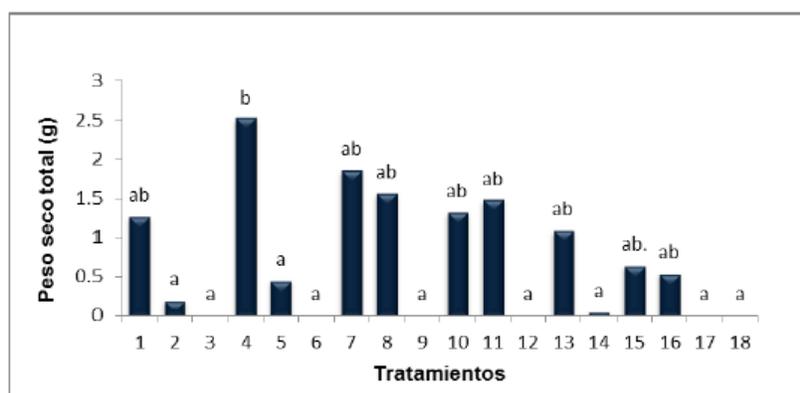


Figura 2. Biomasa seca total del axihuitl a los 180 días después de establecida. T1 (M.O. 5% + *Rhizophagus intraradices*); T2 (M.O. 2.5% + *Rhizophagus intraradices*); T3 (M.O. 0% + *Rhizophagus intraradices*); T4 (M.O. 5% + Cerro del metate); T5 (M.O. 2.5% + Cerro del metate); T6 (M.O. 0% + Cerro del metate); T7 (M.O. 5% + El Limón); T8 (M.O. 2.5%+ El Limón); T9 (M.O. 0% + El Limón); T10 (M.O. 5% + Las Campesinas); T11 (M.O. 2.5%+ Las Campesinas); T12 (M.O. 0% + Las Campesinas); T13 (M.O. 5% + Copalcohuitl); T14 (M.O. 2.5%+ Copalcohuitl); T15 (M.O. 0% + Copalcohuitl); T16 (M.O. 5%); T17 (M.O. 2.5%); T18 (Arena Sin/HMA). Barras con la misma letra son estadísticamente similares Tukey (P<0.05).

Conclusiones

Las plantas de axihuitl no son capaces de sobrevivir en ausencia de materia orgánica. En nuestro caso requirieron como mínimo para su supervivencia un 2.5%. Los tratamientos que presentaron el mayor crecimiento fueron denle donde se usó como inóculo Cerro del Metate con un nivel de materia orgánica al 5% y el tratamiento de inóculo El Limón con materia orgánica al 2.5%. En general, los consorcios nativos mostraron un mayor efecto en el crecimiento de las plantas de axihuitl respecto al inóculo comercial *Rizophagus intraradices*.

Referencias bibliográficas

Baslam M., Esteban R., García P.J.I., Goicoechea N. 2013. Effectiveness of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) for Inducing the Accumulation of Major Carotenoids, Chlorophylls and Tocopherol in Green and Red Leaf Lettuces. Applied Microbial and Cell Physiology. 97: 3119-3128.

Influencia de la micorrización y materia orgánica en el crecimiento y la producción de sustancias bactericidas del axihuitl 2015



- Fernández F. O., Carrillo G. R., Vangronsveld J., González C. M. C. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi and Zn Accumulation in the metallophytic plant *Viola calaminaria* (Gingins.) Lej. Rev Chapingo Ser Hortíc 14:355–360.
- Godínez V. A. M. 2012. Efecto antimicrobiano in vitro de extractos de *Eupatorium aschembornianum* sobre *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. [Tesis]. [Guadalajara (Jalisco)]: Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. 98 pp.
- Pedone B.M.V.L., Lins M.A., Coehlo L.R., Santana S.A., Silva F.S.B., Maia L.C. 2013. Mycorrhizal technology and phosphorus in the production of primary and secondary metabolites in cebil (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) seedlings. J Sci Food Agric; 93: 1479–1484.
- Rincón G., Quiñones A.E.E. 2010. Uso del “axihuitl”, una planta mexicana, en tecnologías de control biológico de enfermedades de plan. Hypatia - Revista de Divulgación Científico - Tecnológica del Estado de Morelos. [Internet]. [Consultado el 3 de diciembre de 2012]. Revista no. 35. Disponible en: http://hypatia.morelos.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=616&Itemid=551
- Smith S. E., Read D. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. The University Press Cambridge. Great Britain. 2nd edition. 787 pp.
- Van der Heijden M.G.A., Sanders I.R.S. 2003. Mycorrhizal ecology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Printed in Germany. 2nd edition. 52 pp.
- Zeng Y., Ping G.L., Dong C.B., Peng H.Z., Yong W.J., Qui H.L., Yang G., Ming C.X., Yang L., Xiang W.Z., Lan C.M., Yan Z. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and prospectives. Mycorrhiza. 23: 253-26.



El Gobierno del Estado de Michoacán a través del Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación otorga la presente:

Constancia

A: **LUIS LÓPEZ PÉREZ, SUSANA GARCÍA TÉLLEZ, GABRIEL RINCÓN ENRÍQUEZ, EVANGELINA QUIÑÓNEZ AGUILAR, SYLVIA FERNÁNDEZ PAVIA, NURIA GÓMEZ DORANTES**

Por haber presentado la Ponencia:
INFLUENCIA DE LA MATERIA ORGÁNICA Y HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES (HMA) EN EL CRECIMIENTO DEL AXIHUITL (EUPATORIUM ASCHEMBORNIANUM).

En el marco de las actividades académicas organizadas en el **9º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y Tercer Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán**, celebrado el 16 y 17 de octubre de 2014.

Morelia, Mich., a 17 de Octubre de 2014.


Dra. Esther García Garibay
Directora General del Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación

