



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Facultad de Biología

División de estudios de Posgrado

EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL MAÍZ (*Zea mays*) SU ASOCIACIÓN
MICORRIZICA ARBUSCULAR Y LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL
SUELO

TESIS

Que como requisito para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIA BIOLÓGICAS

Área temática: Interacción Planta-Microorganismo-Insecto

Presenta:

Biol. María del Rocío Madrigal Pedraza

Directoras de Tesis:

DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD
DRA. MAYRA GAVITO PARDO

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, AGOSTO DE 2012

ÍNDICE

	Página
Índice de cuadros	ii
Índice de figuras	iii
I.RESUMEN	1
II.SUMMARY	2
III.INTRODUCCIÓN GENERAL	3
III.1 JUSTIFICACIÓN	4
III.2 MARCO TEÓRICO	5
III.2.1 La rizósfera	6
III.2.2 Microorganismos de la rizósfera	7
III.2.3 Los HMA: características y beneficios	8
III.2.4 Los HMA e interacción con otros microorganismos	10
III.2.5 Microorganismos del suelo y metales	12
III.2.6 Aluminio y HMA	12
III.2.7 Ácidos grasos	13
IV. Hipótesis	15
V. Objetivo General	16
VI. Material y métodos	17
VI.1 Suelo y material biológico	17
VI.2 Diseño experimental	17
VI.3 Montaje del experimento	17
VI.4 Cosecha y análisis	23
VI.5 Colonización de los HMA	24
VI.6 Micelio micorrízico arbuscular	24
VI.7 Pesos secos de las plantas	25
VI.8 Microbiota asociada a la rizósfera	25
VI.9 Concentraciones de Fósforo y Nitrógeno	26
VI.10 Análisis estadísticos	26
VII. Resultados	27
VII.1 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de aluminio sobre la colonización de los HMA asociados a la rizósfera de plantas de maíz.	27
VII.2 Determinación del efecto de las diferentes concentraciones de aluminio sobre las plantas de maíz.	29
VII.3 Concentración de fósforo y nitrógeno en las plantas de maíz en los diferentes tratamientos de aluminio e inoculación	35
VII.4 Cuantificación de la microbiota asociada a la rizósfera de las plantas de maíz bajo diferentes concentraciones de aluminio en el suelo.	37
VIII. Discusión	46
IX. Conclusiones	54
X. Referencias	55

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Relación de pH en diferentes proporciones de suelo-arena en la aplicación de distintas cantidades de aluminio	22
Tabla 2. Valores de Probabilidad (<i>P</i>) a partir de análisis de varianza de porcentaje de colonización de raíces, con diferentes tipos de inóculos de HMA y distintos niveles de aluminio. *, <0,05; **, <i>P</i> <0.01; ***<0.001	26
Tabla 3. Valores de probabilidad (<i>P</i>) del análisis de varianza de las variables referentes al desempeño vegetal de las plantas de maíz con los diferentes inóculos de HMA y los distintos niveles de aluminio como factores principales. *, <i>P</i> < 0.05; **, <i>P</i> < 0.01; ***, <i>P</i> < 0.001	29
Tabla 4. Valores de probabilidad (<i>P</i>) a partir del análisis de varianza de la concentración de N y P en la parte aérea para conocer el estado nutricional de las plantas con distintos HMA y niveles de aluminio. *, <i>P</i> < 0.05; **, <i>P</i> < 0.01; ***, <i>P</i> < 0.001	35
Tabla 5 Análisis de varianza de la densidad de micelio y la abundancia de los biomarcadores de ácidos grasos indicadores de los diferentes microorganismos en la hifósfera en los distintos tratamientos con HMA y niveles de aluminio. *, <i>P</i> < 0.05; **, <i>P</i> < 0.01; ***, <i>P</i> < 0.001	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática del concepto de rizósfera en contraste con el concepto de micorrizósfera e hifósfera. (Tomado y modificado de Johansson <i>et al.</i> , 2004).	7
Figura 2 Sistema de crecimiento elaborado con PVC de 4" de diámetro con un compartimiento lateral donde creció el micelio micorrízico arbuscular en los diferentes tratamientos llevados a cabo; se muestra la colocación de una malla de nylon que permitió solo la entrada de micelio a la zona lateral y una zona buffer que separaba la parte lateral de la central para evitar que el aluminio pase de una zona a otra.	18
Figura 3 Ubicación la parcela de la ciudad de León, Guanajuato donde se tomaron las muestras de suelo, que fue utilizado como inóculo.	19
Figura 4. Espora de <i>Acaulospora delicata</i> , donde se muestra el sacúlo desprendido y la pared de la espora con sus dos capas. (Tomado y modificado de INVAM, 2012).	20
Figura 5. Espora de <i>Gigaspora margarita</i> , donde se muestra la pared de la espora con sus tres capas. (Tomado y modificado de INVAM, 2012)	21
Figura 6 Demostración de la forma como se llevo la inoculación de los diferentes inóculos de HMA y los niveles de aluminio. Se muestra como la inoculación se llevo en dos niveles.	23
Figura 7 Promedios (\pm D.E., n=15) de los porcentajes de colonización micorrízica en las raíces en los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	28
Figura 8 . Estructuras observadas en las observaciones de colonización de los diferentes tratamientos de izquierda a derecha. Raíces colonizada con vesículas y micelio.	28
Figura 9 Promedios (\pm D. E., n=15) de los pesos de la raíz de las plantas de maíz de acuerdo con los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	30

Figura 10	Promedios (\pm D.E., n=15) de los pesos secos de la parte aérea de las plantas con los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	31
Figura 11	Promedios (\pm D.E., n=5) de altura de las plantas con los diferentes tratamientos, mostrando la interacción entre las dos variables. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	32
Figura 12	Promedios (\pm D.E., n=5) de diámetro de las plantas de los diferentes tratamientos con los dos factores combinados. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	33
Figura 13	Promedios (\pm D.E., n=15) de la biomasa total de las plantas de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	34
Figura 14.	Promedios (\pm D.E., n=5) de la concentración de nitrógeno en el tallo de las plantas de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	36
Figura 15	Promedios (\pm D. E., n=15) de la concentración de fósforo en el tallo de las plantas de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	37
Figura 16	Promedios (\pm D. E., n=15) de la densidad del micelio de los HMA en el suelo del compartimiento lateral de los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	39
Figura 17	Promedios (\pm D. E., n=15) de la abundancia de los biomarcadores de actinomicetos asociados a la hifosfera en los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.	40

- Figura 18** Promedios (\pm D.E., n=15) de la abundancia de los biomarcadores de bacterias asociadas a la hifósfera de los HMA de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos. **41**
- Figura 19** Promedios (\pm D.E., n=15) de la abundancia de los biomarcadores de hongos saprótrofos encontrados en la hifósfera de los HMA con los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos. **42**
- Figura 20** Promedios (\pm D.E., n=15) de la abundancia de los biomarcadores de HMA encontrados en la parte lateral del sistema diseñado de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos. **43**
- Figura 21** Promedios (\pm D.E., n=15) del cociente de la abundancia de los biomarcadores ácido graso neutro y ácido graso fosfolipídico (NLFA/PLFA) 16:1 ω 5 para determinar el estado fisiológico de los HMA. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos. **44**
- Figura 22.** Análisis de componentes (PCA) de los perfiles de ácidos grasos microbianos obtenidos a partir del análisis del conjunto de lípidos celulares extraídos del suelo con los diferentes tratamientos con los tres inóculos (abreviados como **Tes**=testigo, **Ad**=*Acaulospora delicata*, **Gm**=*Gigaspora margarita* y **PN** =población nativa de suelo contaminado con Al) y los niveles de aluminio (indicados después de la abreviatura del inóculo, como 0, 50 y 100 ppm Al). El resto de los vectores es una selección de los biomarcadores más importantes en la definición de estos grupos e indican: **Bac**=bacterias, **HSaprob**=Hongos saprótrofos, **HMA**= Hongos micorrízicos arbusculares, **Microb Tot**=Microbios totales. Si había más de un marcador de cada grupo microbiano se indica con letras a, b, c, etc. **45**

I. RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) pueden ayudar a remediar suelos y proteger a las plantas de elementos tóxicos. Sin embargo, la mayoría de los trabajos en suelos contaminados se centran en las plantas y aún se desconocen los elementos y los niveles en que estos afectan a los microorganismos del suelo, incluyendo a los HMA. El objetivo de este trabajo fue cuantificar los efectos del aluminio sobre el desarrollo y la colonización del maíz inoculado con 3 inóculos de HMA y la microbiota asociada a la hifósfera de los HMA.

El experimento tuvo dos factores: 1) aluminio en suelo (0, 50 y 100 ppm) y 2) inóculos de HMA (*Acaulospora delicata*, *Gigaspora margarita*, población nativa de un suelo contaminado y un testigo sin HMA). Maíz de la variedad NB9 se sembró en un sistema de PVC con un compartimiento central en el que se inocularon los HMA y un compartimiento lateral sin raíces donde creció solo el micelio de los HMA y los microorganismos asociados a la hifósfera y en donde fueron colocadas las diferentes concentraciones de Al. Se usó la técnica de ácidos grasos de célula completa para cuantificar los HMA y los microorganismos asociados a la hifósfera bajo las diferentes concentraciones de aluminio. El micelio micorrízico arbuscular del compartimiento lateral también se extrajo y cuantificó por microscopía.

Los resultados muestran que concentraciones de hasta 100 ppm de aluminio no alteraron el crecimiento ni de los HMA en las raíces ni del maíz, al que solamente podía haber llegado al ser transportado por los HMA. El inóculo de la población nativa proporcionó mayor altura y peso a las plantas que *A. delicata* y *G. margarita* y el testigo, los cuales fueron similares. Al analizar el desarrollo de los HMA se observa que las concentraciones de aluminio suministradas no afectaron al micelio de los HMA y que el inóculo de *A. delicata* fue el que tuvo un mayor porcentaje de colonización y longitud de micelio. Al realizar los estudios de biomarcadores de ácidos grasos fue posible observar que las concentraciones de aluminio suministradas no afectaron las comunidades microbianas y que el inóculo de *A. delicata* contenía mayor cantidad de microorganismos, de los cuales las bacterias fueron siempre las que se encontraron en mayor cantidad. Estos resultados permiten señalar la

capacidad de los HMA para enfrentar situación de estrés y la amplia gama de respuestas que se observan entre las combinaciones hongo-planta

II. SUMMARY

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can help remediating contaminated soils and protecting plants from toxic elements. However, most of the work in contaminated soils is focused on the plants and the elements and concentrations that affect micro-organisms in soil, including AMF, are still largely unknown. The objective of this study was to quantify the effects of aluminum on the development and colonization of 3 inocula of AMF and on the microbiota associated to the hyphosphere of AMF.

The experiment had two factors: 1) aluminum added (0, 50 y 100 ppm) and 2) AMF inocula (*Acaulospora delicata*, *Gigaspora margarita*, the native population of an aluminum contaminated soil and a control without AMF). Maize cultivar NB9 was grown as a host in a PVC system with a central compartment where the AMF were inoculated and a lateral compartment without roots where only the mycelium of AMF and the associated microorganisms could grow and the different concentrations of Al were placed. The whole cell fatty acid technique was used to quantify the AMF and micro-organisms associated to the hyphosphere under three concentrations of aluminum. The arbuscular mycorrhizal mycelium in the lateral compartment was also extracted and quantified by microscopy.

Results showed that concentrations up to 100 ppm aluminum did not alter the growth of maize or AMF in the roots, given that Al could only reach plants through transport by the mycorrhizal mycelium. The inoculum containing the native population of a contaminated soil resulted in greater plant height and weight, while *A. delicata*, *G. margarita* and the control were similar. In terms of the development of the AMF, *A. delicata* showed a higher percentage of colonization in roots and length of mycelium. The inoculum of *A. delicata* had the largest abundance of microorganisms, that were always mainly bacteria. These results point out the ability of AMF to cope with stress and the wide range of response observed between fungus and plant combinations.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

En años recientes varios estudios han mostrado los daños efectuados por los metales en la diversidad de microorganismos y su actividad en el suelo. La contaminación del ambiente con metales surge como resultado de actividades humanas, principalmente industriales, sin embargo, fuentes como la agricultura y la eliminación de residuos también contribuye (Del Val *et al.*, 1999).

En México, al igual que en muchos países, la prevención de la contaminación del ambiente (suelo, agua y aire) y su recuperación es una prioridad. La Biotecnología del suelo nace como una rama trascendental dentro de la ciencia del suelo, y los resultados muestran el enorme potencial de los microorganismos del suelo, en el mejoramiento de la calidad del suelo, degradación e inmovilización de contaminantes, su efecto en el crecimiento y en la protección de las plantas frente a diferentes factores. Como resultado, se incrementa el interés de los investigadores por la aplicación de los microorganismos en diferentes áreas. Dentro de los métodos biológicos de recuperación de suelos contaminados por metales pesados, metaloides y otros contaminantes, el uso de plantas y microorganismos rizosféricos representa una alternativa de bajo costo y con enormes ventajas ambientales (González-Chávez, 2005).

Los microorganismos del suelo juegan un papel clave en la movilización e inmovilización de los cationes de los metales, así como en los cambios de su disponibilidad para las plantas. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos del suelo que establecen una simbiosis mutualista con la mayoría de las plantas superiores, proporcionando un enlace físico directo entre el suelo y las raíces de las plantas. Los HMA se encuentran en todos los hábitats y climas, incluyendo en suelos con disturbios como los derivados de las actividades de las minas, pero en suelos degradados usualmente se producen cambios en la diversidad y abundancia de las poblaciones de los HMA (Batista y Sánchez, 2009).

Los HMA son un factor importante en la adaptación de plantas a los suelos contaminados por algunos metales como el aluminio. Se conoce que los HMA favorecen y aumentan la capacidad de nutrimentos a la planta, particularmente fósforo, el cual puede ser importante para la exposición al aluminio (Cumming, 2001). A pesar de que los HMA son considerados importantes en la toma de nutrientes inmóviles, ellos también juegan un papel en la reducción de toma de metales pesados (Wu *et al.*, 1987).

Sin embargo existen pocos estudios que indagan sobre la dinámica de microorganismos cuando se presenta una zona contaminada o degradada. En el presente proyecto se pretende evaluar el efecto del aluminio sobre la comunidad de hongos micorrízicos arbusculares y sus microorganismos asociados en plantas de maíz.

III.1. JUSTIFICACIÓN

Aunque existen una amplia variedad de estudios importantes sobre los hongos micorrízicos arbusculares son pocos los que se enfocan realmente al impacto que se tiene sobre estos en ambientes contaminados, en su mayoría son enfocados sobre el desarrollo de las plantas, puesto que se sabe que llegan a provocar daños drásticos en las cosechas de muchos cultivos importantes como el maíz, frijol, etc. causando drásticos daños en la economía de muchos países del mundo. La toxicidad del aluminio en el suelo es un problema que afecta el 30-40% de las tierras cultivables del mundo, sólo superada por la sequía lo cual representa un impedimento para maximizar los rendimientos de los cultivos. Los suelos altamente degradados, o aquellos que se desarrollaron en material ácido, exhiben un bajo pH, limitando la disponibilidad de cationes base, y elevando los niveles de disponibilidad del aluminio (Kelly *et al.*, 2005).

Es por ello que actualmente se retoma la importancia de dar soluciones sostenibles al problema de la contaminación de los suelos puesto que este representa el sustento para el desarrollo de una amplia variedad de cultivos que dan alimento a una gran parte de la humanidad.

El comprender de mejor manera el desarrollo y el comportamiento de los hongos micorrízicos arbusculares y sus microorganismos asociados es sumamente importante ya que esto puede dar las armas necesarias para manipular de manera exitosa el efecto benéfico de estos microorganismos frente a condiciones de estrés por metales que impiden el desarrollo de las plantas de la zona contaminada, así como problemas críticos como la agricultura y sostenimientos de bosques.

De esta forma el principal objetivo de este trabajo es el de comprender el desarrollo del micelio micorrízico y los microorganismos asociados a éste al entrar en contacto con concentraciones ascendentes de aluminio en el suelo.

III.2 MARCO TEÓRICO

III.2.1 La Rizósfera

Muchos estudios han demostrado que los microorganismos del suelo interactúan con las raíces de las plantas y componentes del suelo en la interfaz suelo-raíz (Barea *et al.*, 2005).

Hiltner (1904) fue el primero en introducir el término rizósfera la cual es derivada de la palabra griega “rhiza” que significa raíz, y “sphere” que significa zona de influencia. La rizósfera se define como la zona de suelo inmediata adyacente a la raíz de leguminosas que soporta niveles altos de actividad bacteriana. Sin embargo más recientemente, el término se ha ampliado para incluir tanto el volumen de suelo influenciada por la raíz de las plantas colonizadas por microorganismos (Morgan *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2004; Kuffner *et al.*, 2008).

Las raíces de las plantas son comúnmente micorrizadas tanto en ambientes naturales como seminaturales, por lo cual el concepto de rizósfera ha sido ampliado para incluir el componente fúngico de la simbiosis, resultando en el término de “micorrizósfera” (Sanon *et al.*, 2009; Johansson *et al.*, 2004). La micorrizósfera es la zona de influencia para la raíz y el micelio del hongo, y incluye un término más específico “hifósfera” el cual se refiere solo a la zona que rodea a la hifa del hongo (Johansson *et al.*, 2004) (Fig. 1).

Los microorganismos de la rizósfera reaccionan a los muchos metabolitos liberados por las raíces de las plantas. Los microorganismos y sus productos, también interactúan con las raíces de las plantas en una variedad de caminos de positivo, negativo y neutral (Bueé, 2009). Tales interacciones pueden influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas, cambios en la dinámica de nutrientes y susceptibilidad a enfermedades y estrés abiótico (Bueé, 2009).

De la misma forma diferentes características físicas, químicas, y las propiedades biológicas del suelo son responsables de los cambios en la diversidad, aumento y la actividad de los microorganismos en la rizósfera (Barea *et al.*, 2005).

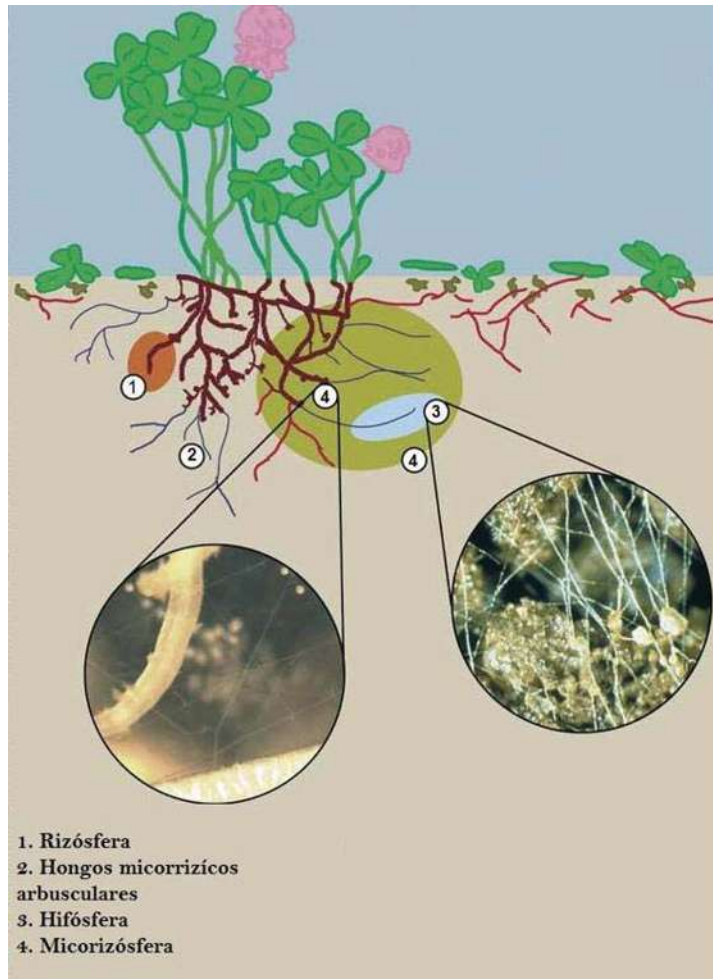


Figura 1. Representación esquemática del concepto de rizósfera en contraste con el concepto de micorizósfera e hifósfera. (Tomado y modificado de Johansson *et al.*, 2004).

III.2.2 Microorganismos de la rizósfera

La rizósfera es un ambiente que la propia planta ayuda a crear y donde los microorganismos patógenos y benéficos constituyen una fuerza importante en la influencia del crecimiento y salud de las plantas. El grupo de microbios y otros agentes que se encuentran en la rizósfera incluyen bacterias, hongos, nematodos, protozoos, algas y microartrópodos. Muchos miembros de esta comunidad tienen un efecto neutro sobre la planta, y forma parte de la compleja red alimentaria que utiliza la gran cantidad de carbono que es fijada por la planta y se libera a la rizósfera. La comunidad en la rizósfera también alberga miembros que ejercen efectos perjudiciales y benéficos sobre la planta. Los microorganismos que afectan negativamente el crecimiento vegetal y la salud de la planta son los hongos patógenos,

oomicetos, bacterias y nematodos, mientras que los microorganismos que son benéficos incluyen bacterias fijadoras de nitrógeno, los hongos endo y ectomicorrizicos, rizobacterias promotoras del crecimiento. El número y la diversidad de microorganismos perjudiciales y beneficiosos están relacionados a la cantidad y calidad de los depósitos de carbono y por el resultado de las interacciones microbianas que se producen en la rizósfera (Raaijmakers *et al.*, 2009).

Entre las interacciones antagonicas que pueden llevar a cabo los microorganismos son la competencia por factores limitantes como son el C, N, P como principales, competencia por los sitios de la colonización y los nutrientes suministrados por semillas y raíces; la producción de sustancias inhibidoras o tóxicas, el parasitismo que puede implicar la producción de enzimas extracelulares (Whipps, 2001).

III.2.3 Los HMA: características y beneficios

La asociación dada entre algunos grupos de hongos y un gran número de plantas es considerada un clásico ejemplo de simbiosis mutualista. La interacción más común es la asociación micorrizica arbuscular, la cual es formada entre las raíces de la mayoría de las plantas superiores y los hongos pertenecientes al phylum Glomeromycota (Guadarrama y Sánchez, 2004). La asociación micorrizica arbuscular se estima que ocurre en el 80% de las familias de las plantas terrestres incluyendo muchas especies importantes de la agricultura. La asociación micorrizica arbuscular representa una simbiosis ancestral, existen fósiles que evidencian esta asociación que datan de 400 millones de años (Pivato *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2010) y parece haberse dispersado y evolucionado junto con las primeras plantas terrestres (Allen, 2007).

Los hongos formadores de micorriza arbuscular son simbiosiontes obligados y no pueden cultivarse fuera de las raíces vivas de las plantas por que dependen totalmente del carbono fotosintético de la planta (Smith y Read 1997). Las esporas de estos hongos germinan en el suelo y colonizan las células corticales de una planta huésped. El hongo, dentro de la raíz, invagina el plasmalema de la célula vegetal y produce una estructura profusamente

ramificada llamada arbusculo, que es el sitio de intercambio de nutrimentos entre el hongo y la planta. La formación de esta estructura es una característica común de todos los hongos micorrízicos arbusculares (Van der Heijden, 2001).

Los HMA al colonizar una gran variedad de especies de plantas, y presentar poca especificidad de huésped pueden llegar a interconectar las plantas por medio de una red micelial común (Dupré de boulois *et al.*, 2006). En esta asociación el hongo ofrece un beneficio a su huésped a cambio de recibir otro, es decir, hay un beneficio mutuo producto de un intercambio bidireccional “hongo-planta”: la planta suministra al hongo fuentes de carbono procedentes de la fotosíntesis (proceso que el hongo no puede realizar) y le brinda protección; mientras que el hongo le facilita a la planta la absorción de agua y nutrimentos como fósforo y nitrógeno, recursos del suelo que en condiciones extremas la planta difícilmente obtendría eficientemente sin la ayuda del hongo (Montaño *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que las plantas micorrizadas incrementan la captación de nutrimentos minerales, especialmente aquellos que son poco móviles en el suelo, como fósforo, cobre y zinc. También se ha observado que reducen la tensión fisiológica causada por microorganismos patógenos de la raíz y condiciones ambientales extremas (Smith y Read 1997).

El micelio externo formado por los HMA se extiende varios centímetros alrededor de la raíz incrementando el volumen de suelo que puede ser explorado. Este micelio es muy importante en la captación y transporte de nutrimentos y agua hacia la planta. Se ha demostrado que el fósforo es captado más eficientemente por las hifas del hongo y que una vez dentro del micelio, se transporta a mayor velocidad que en el suelo, lo que impide que se forme una zona de agotamiento de este elemento alrededor de la raíz como sucede en las plantas no micorrizadas (Sanders *et al.* 1977).

Por otro lado, los HMA interaccionan con microorganismos rizosféricos y con la microbiota fuera de la influencia de la raíz formando una micorrizósfera en donde se ha observado que se estimulan, inhiben y seleccionan grupos microbianos específicos. A su vez, los microorganismos del suelo promueven o contrarrestan el desarrollo de la micorriza (Azcón-Aguilar y Barea 1992).

La efectividad de los HMA se ha evaluado midiendo el incremento en biomasa o concentración de fósforo en las plantas, asumiéndose cierto grado

de redundancia funcional. Sin embargo, es importante reconocer que los ecosistemas tienen grupos de especies con funciones específicas y que la desaparición de algunas de ellas puede causar modificaciones en la productividad del ecosistema (Van der Heijden *et al.* 1998).

Recientemente se ha dado otro enfoque al estudio de los HMA y se ha establecido que estos organismos participan en la formación y mantenimiento de agregados del suelo (Wright y Upadhyaya, 1998) y juegan también un papel muy importante en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas y en los procesos de sucesión. Los HMA son considerados componentes clave de la microbiota del suelo, que llevan actividades cruciales para el establecimiento, nutrición, desarrollo y salud de las plantas (Montaño *et al.* 2007). Se considera que estos hongos son más importantes en los suelos de bosque tropicales pobres en fósforo disponible. Dichos ecosistemas son reservorios potenciales muy ricos de especies no descritas. Lamentablemente estos hábitats han sido poco estudiados y son arrasados mundialmente a una velocidad alarmante (Ehrlich y Wilson 1991).

III.2.4 Los HMA e interacción con otros microorganismos

En ecosistemas terrestres muchas de las especies son comúnmente asociadas con HMA, los cuales son considerados como componentes claves de las poblaciones microbianas que influyen en el crecimiento de las plantas y la absorción de nutrientes. La simbiosis micorrizica generalmente incrementa la exudación de la raíz, modificando el metabolismo de los carbohidratos de la planta hospedera y la influencia de la rizósfera de las comunidades microbianas. Además los HMA pueden exudar sustancias que tienen un efecto selectivo sobre la microbiota del suelo (Sanon *et al.*, 2009).

Muchas bacterias son conocidas por ser capaces de estimular el crecimiento de las plantas a través de interacciones directas o indirectas con las raíces de las plantas y estas son clasificadas como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR). Sin embargo, los beneficios de la colonización de los HMA y bacterias son estudiadas por separado. Solo recientemente los efectos sinérgicos de bacterias y hongos han sido estudiados con respecto a su combinación benéfica sobre las

plantas (Artursson *et al.*, 2006).

Existe poca información sobre los mecanismos que controlan la interacción de bacterias y HMA la raíz en la rizósfera; sin embargo un número de posibles alternativas son propuestas. Se ha demostrado que algunas bacterias afectan directamente la germinación de los HMA y su tasa de crecimiento y por lo tanto el impacto benéfico para la planta podría ser a través de la asociación con los HMA. Otras bacterias pueden influir directamente sobre la fisiología de las plantas, por ejemplo, mediante el aumento de células permeables de la raíz. Bacterias específicas junto con los HMA pueden crear una sinergia mas indirecta para soportar el crecimiento de las plantas, incluyendo la adquisición nutrientes, inhibición de hongos patógenos de plantas y mejoramiento de la ramificación de la raíz (Johansson *et al.*, 2004).

Además de estos efectos de las bacterias sobre los HMA, estos también han demostrado tener un impacto en la composición de las comunidades bacterianas (Artursson *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2004). Este impacto puede ser transmitido a través de la raíz de la planta porque el establecimiento de la micorriza ha mostrado cambios en la composición química de los exudados de las raíces y éstas son a menudo una fuente de nutrientes para bacterias asociadas a la micorrizósfera (Morgan *et al.*, 2005). Sin embargo, los cambios en la composición y la actividad de las comunidades bacterianas por los HMA también se han atribuido a una interacción más directa, incluida la competencia por los nutrientes inorgánicos. Además, algunos estudios han demostrado que algunas especies bacterianas responden a la presencia de ciertos HMA, lo que sugiere un alto grado de especificidad entre las bacterias asociadas con HMA. Una posible explicación para la estimulación de ciertas especies de bacterias por HMA específicos puede ser que estas bacterias son activadas por exudados de hongos específicas de ciertas especies (Barea *et al.*, 2004; Artursson *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2005).

III.2.5 Microorganismos del suelo y metales

Los metales son tóxicos a la mayoría de los microorganismos del suelo cuando están presentes en excesivas concentraciones, inhibiendo su presencia y actividad en el suelo. Los microorganismos presentan mecanismos que permiten la resistencia a metales (Giller *et al.*, 1998). A pesar de que los mecanismos no están del todo claros se conoce que los microorganismos pueden aumentar la solubilidad y el cambio de especiación de los metales a través de la producción de quelantes orgánicos, a través de la descomposición de la materia orgánica y la exudación de metabolitos y sideróforos microbianos, resultando en la inmovilización o movilización. Los microorganismos pueden inmovilizar metales también en varias formas, ellos pueden tomar los elementos y acumularlos en su biomasa por vía intracelular (Wenzel, 2009).

III.2.6 Aluminio y HMA

Estudios llevados a cabo en suelo contaminados con metales, muestran efectos perjudiciales sobre la actividad y diversidad de las poblaciones microbianas (Del Val *et al.*, 1999). Los HMA son los componentes más comunes de las poblaciones microbianas del suelo y estudiar su actividad es importante porque genera información sobre la dinámica de los nutrientes en el suelo. El mejor indicador es la longitud del micelio externo. Esta es la estructura más importante, por formar la interfase entre el suelo y la planta. Es fundamental en la transferencia de nutrientes que se difunden lentamente en el suelo como el fósforo. Como consecuencia se cree que hay mejoría en las relaciones hídricas en la planta, el micelio externo mejora las condiciones físicas del suelo favoreciendo la agregación, al generar redes indispensables para la formación de macroagregados, además de los beneficios en el mantenimiento de las plantas. Se ha logrado establecer relaciones entre la longitud del micelio externo, con factores como: propiedades físicas del suelo, labranza, cobertura del suelo, tipo de cultivo, disponibilidad de fósforo, entre otros (Paz y Sánchez, 2007).

Los hongos micorrízicos están ampliamente establecidos en suelos contaminados con metales y la colonización de las raíces de las plantas por los

HMA con frecuencia mejora la supervivencia de las plantas y aumenta su crecimiento en estos suelos. Los mecanismos que le confieran esta resistencia, no son claros y pueden diferir entre metales y hongos. La resistencia al estrés de la planta hospedera bajo la exposición a los metales puede ser relacionada al incremento de fósforo. La toma de metales y translocación a la parte aérea de la planta puede ser reducido por la quelación del metal en la micorizósfera, unión del metal a la pared celular de la hifa, o por retención celular en los tejidos del hongo (Kelly *et al.*, 2005).

El papel de los HMA en la mediación de la toxicidad del aluminio tóxico puede ser especialmente influido por la inducción de deficiencias de fósforo como respuesta de la planta. La extensa red externa de hifas explora un gran volumen de suelo y puede alcanzar los escasos recursos de nutrientes que de otro modo no están disponibles por las raíces, debido a que las plantas expuestas al aluminio presentan inhibición de la división celular y la elongación de la raíz, la cual es uno de los más marcados y tempranos síntomas de la toxicidad de este metal, que ocurre dentro de unas horas o incluso minutos después de la exposición al aluminio (Giannakoula *et al.*, 2010). Además, los HMA puede reducir la acumulación de otros elementos, tales como Fe, y Mn, que son problemáticos en suelos ácidos (Cumming y Ning, 2003).

III.2.7 Ácidos grasos

A pesar de que los ecosistemas son completamente dependientes de los microorganismos, la estructura de la comunidad microbiana, la predicción de cómo la estructura responde a las perturbaciones ambientales o los vínculos entre la estructura y procesos de los ecosistemas, han sido difícil de determinar. Existe una enorme diversidad de comunidad microbiana, de la cual solo una pequeña parte ha sido caracterizada (Bossio *et al.*, 1997).

El uso de biomarcadores de ácidos grasos es utilizado para adquirir una visión de la comunidad microbiana en ambientes naturales. Esta técnica se basa en la composición de fosfolípidos (constituyentes de membrana) y lípidos neutros (almacenamiento de energía en eucariotas), los cuales son dos tipos importantes de lípidos que encontramos en los microorganismos

(Olsson, 1999). El análisis de ácidos grasos con fosfolípidos (PLFA) es un método bioquímico que puede proporcionar información detallada acerca de la estructura de la actividad microbiana. El uso de PLFA es como una huella digital de la microbiología del suelo (Bossio *et al.*, 1997). Los ácidos grasos neutros proporcionan un indicación de la acumulación de energía en reservas y la relación de los ácidos neutros con los fosfolípidos en eucariontes refleja el estado nutricional de los microorganismos (Olsson, 1999; Bååth, 2003).

Una de las mayores diferencias en la composición de PLFA de los diferentes organismos se encuentra entre los eucariotas y eubacterias. Se conoce que los PLFAs 18:2 ω 6,9 y 18:1 ω 9 son comunes en organismos eucarióticos como hongos, pero raros en bacterias. Otros PLFAs predominantemente de origen bacteriano son cy17:0 y cy19:0. El PLFA 16:1 ω 5 es usado como indicador de HMA en suelo (Bååth, 2003).

IV. HIPÓTESIS

Se espera que los tratamientos con hongos micorrízicos arbusculares y la microbiota asociada a la hifósfera presenten tolerancia a diferentes concentraciones de Aluminio del suelo, en plantas de maíz (*Zea mays*).

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Aluminio en el suelo en el desarrollo del micelio micorrízico arbuscular, las comunidades microbianas del suelo y plantas de maíz (*Zea mays*).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Suelo y Material biológico

El suelo utilizado en el experimento fue extraído del campo de maíz del Centro Regional Universitario de Centro Occidente (CRUCO) de la ciudad de Morelia Michoacán. El suelo se tamizo y se llevó a cabo una mezcla de suelo con arena en proporción 9:1 para mejorar su aireación y evitar la compactación en las macetas y se esterilizó en autoclave por 1 hr a 120°C y 15 libras de presión por dos ocasiones.

Para este experimento se utilizó como material biológico semillas de maíz de la variedad NB9 y tres inóculos de HMA (*Acaulospora delicata*, *Gigaspora margarita* y población nativa de un suelo contaminado con aluminio).

VI.2 Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en un diseño factorial con dos factores: **1)** aluminio en suelo (tres niveles 0, 50 y 100 ppm) y **2)** tres inóculos de HMA (*Acaulospora delicata*, *Gigaspora margarita*, población nativa de un suelo contaminado con aluminio y un testigo). Un total de 12 tratamientos cada uno con cinco repeticiones (n=60).

VI.3 Montaje del experimento

Las semillas de maíz fueron desinfectadas con una solución de cloro al 10%. Posteriormente se pre-germinaron por tres días y fueron plantadas tres por cada sistema para asegurar que al menos creciera una, posterior a una semana solo se dejó una planta por maceta. Cada maceta contenía una mezcla de suelo de diferentes texturas como se mencionó anteriormente.

Se diseñó un sistema de crecimiento con dos compartimientos (Fig 2) el cual consistió en tubos de PVC de 4" de diámetro, de 31 cm de largo para permitir el crecimiento de la raíz de las plantas de maíz y un compartimiento lateral del mismo diámetro y de 9 cm de largo. Los compartimientos se

separaron por una malla de nylon que presentaba una apertura de $24 \mu\text{M}$ con el objetivo de que solo pasara el micelio de los inóculos colocados en el compartimiento central.

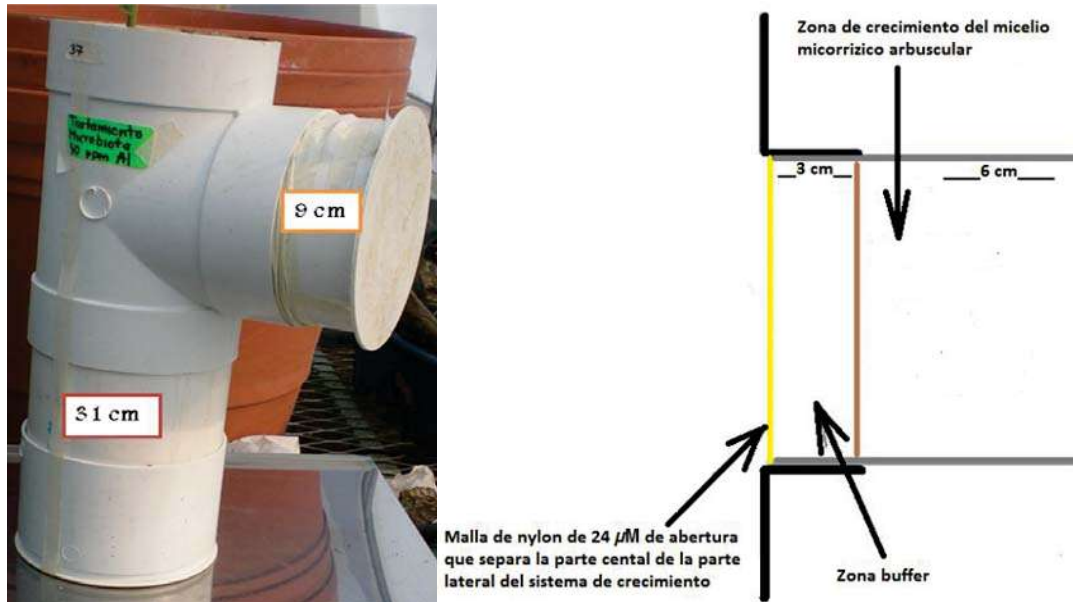


Figura 2. Sistema de crecimiento elaborado con PVC de 4" de diámetro con un compartimiento lateral donde creció el micelio micorrizico arbuscular en los diferentes tratamientos llevados a cabo; se muestra la colocación de una malla de nylon que permitió solo la entrada de micelio a la zona lateral y una zona buffer que separaba la parte lateral de la central para evitar que el aluminio pase de una zona a otra.

En la parte central del sistema de crecimiento se colocaron los inóculos de HMA (*Acaulospora delicata*, *Gigaspora margarita* y la población nativa de un suelo contaminado con aluminio) y un testigo en el cual solo contenía la mezcla de suelo esterilizado. El inóculo de población nativa fue colectado de una parcela de la ciudad de León, Guanajuato, conocida como la "Capital Mundial del Calzado" por sus fábricas de calzado, tenerías, artesanías de piel, talabartería y marroquinería de pieles fina; lo cual es una gran fuente de contaminación a los suelos que se encuentran a su alrededor.

Las coordenadas exactas de los cuatro puntos donde se obtuvo el suelo son: $21^{\circ}05'31.23''\text{N}$, $101^{\circ}43'08.19''\text{O}$ (superior derecha), $21^{\circ}05'27.93''\text{N}$, $101^{\circ}43'13.65''\text{O}$ (superior izquierda), $21^{\circ}05'21.96''\text{N}$, $101^{\circ}43'08.68''\text{O}$ (inferior izquierda), $21^{\circ}05'25.65''\text{N}$, $101^{\circ}43'03.06''\text{O}$ (Inferior derecha) (Fig. 3); dicha

parcela es una zona de cultivo de garbanzo y maíz la cual se encuentra cerca de grandes cortidurías.



Figura 3. Ubicación la parcela de la ciudad de León, Guanajuato donde se tomaron las muestras de suelo, que fue utilizado como inoculo.

Para obtener los inoculantes de *Gigaspora margarita* y *Acaulospora delicata* se aplicó el método de tamizado húmedo y decantación propuesto por Gerdemann y Nicolson (1963) a suelo procedente de una parcela de maíz de la región de Tiripetío Michoacán. Se seleccionaron estas especies por ser las que presentaron la mayor cantidad de esporas. Una vez identificadas las esporas, se aislaron para posteriormente ser propagadas por el método de cultivos trampa. Para esto se utilizó pasto, cuyas semillas fueron desinfectadas y sembradas en macetas con suelo esterilizado en la autoclave. Los cultivos trampa exitosos se multiplicaron añadiendo suelo estéril y nuevas plantas hospederas.

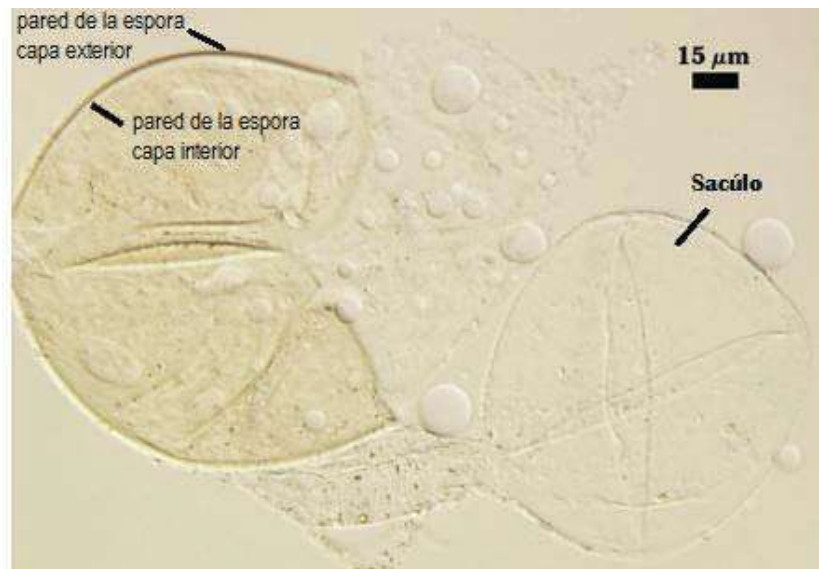


Figura 4. Espora de *Acaulospora delicata*, donde se muestra el sacúlo desprendido y la pared de la espora con sus dos capas. (Tomado y modificado de INVAM, 2012).

Acaulospora aff. delicata Walker, Pfeiffer y Bloss: las esporas son de color hialina a amarillo pálido con tintes verdes, de forma globosa a subglobosa y de 80 a 120 μm. La pared de la espora tiene dos capas, la capa exterior continua con la pared del cuello de la matriz del sacúlo y la capa interior termina con el inicio de la formación de la espora. Las hifas miden alrededor de 6 μm de ancho. La especie propagada se denomina afin a esta especie porque concuerda en la mayoría de las características morfológicas de sus esporas pero son bastante más grandes que el rango descrito (INVAM, 2012).

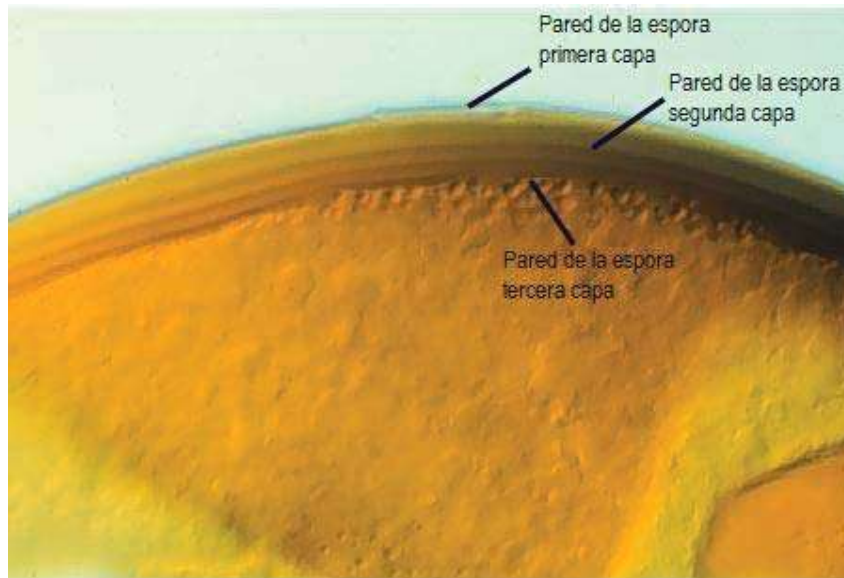


Figura 5. Espora de *Gigaspora margarita*, donde se muestra la pared de la espora con sus tres capas. (Tomado y modificado de INVAM, 2012)

Gigaspora aff. margarita Bentivenga y Morton: Las esporas son de color blanco a crema, con algunas amarillo oscuro, de forma globosas a subglobosas, de tamaño 260-400 μm . la pared de la espora posee tres capas, las hifas miden entre 3-9 μm de ancho, con áreas infladas de hasta 16 μm . La especie propagada se denomina afín a esta especie porque concuerda en la mayoría de las características morfológicas de sus esporas pero son ligeramente más pequeñas que el rango descrito (INVAM, 2012).

En la parte lateral se colocaron los tres niveles de aluminio 0, 50 y 100 ppm. Clark (1997) menciona que el pH de suelo afecta la función de los HMA y su asociación con las raíces de las plantas. Se realizaron pruebas de pH debido a que la aplicación de aluminio reduce el pH del suelo, con el objetivo de que no interviniera como un factor externo al experimento, conociendo que esto podría afectar el comportamiento de los HMA. En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos de las pruebas realizadas:

Tabla 1. Relación de pH en diferentes proporciones de suelo- arena en la aplicación de distintas cantidades de aluminio.

Cantidades de Aluminio (ppm)	Proporciones de suelo /arena			
	Suelo (CRUCO)	1:1	1:4	9:1
0 ppm	6.15	6	6	6
50 ppm		5.11		5.77
100 ppm	4.95	5.07	4.44	5.72
150	4.56			5.50
200 ppm	4.29	4.61	4.46	5.37
400 ppm		4.22	4.13	5.23

Tomando en cuenta estos resultados se considero que las concentraciones de aluminio aplicadas serían solo 0, 50, 100 ppm de aluminio; para mantener el pH a menos de media unidad de cambio y dentro del rango óptimo de pH para el crecimiento de los HMA. La relación de suelo fue de 9:1, la que presento mayor estabilidad y menor acidificación adecuada para el experimento.

Para la aplicación del aluminio la mezcla de suelo 9:1 fue extendida en charolas y se roció uniformemente con cloruro de aluminio disuelto en agua, el suelo se humedeció totalmente y se dejo secar al sol para permitir la adsorción del aluminio al suelo. Al tratamiento testigo se le roció agua y se procesó igual que los tratamientos de aluminio. El suelo se empacó en el compartimiento lateral dejando un espacio al final para colocar una capa de suelo sin adición de Al y crear así una zona buffer esta zona de amortiguamiento evitaría la difusión y el flujo de aluminio entre el suelo colocado en la parte central y la parte lateral. Los diferentes inóculos fueron colocados en dos capas que incluían suelo y raíces de las macetas de propagación en la parte central de cada maceta (Fig 4). Las plantas de maíz se mantuvieron al 70% de su capacidad de campo en un invernadero para lo cual las plantas se pesaban un par de veces por semana y solo se les colocaba la cantidad de agua para llegar

al peso deseado. De la misma forma cada vez que las plantas se regaban se movían de lugar para evitar que la estabilidad de un solo sitio influyera en los resultados. Cuando las plantas crecieron por seis semanas se aplicó nitrógeno y fósforo para evitar la deficiencia de nutrientes por el espacio reducido de crecimiento, ya que las plantas comenzaron a ponerse amarillas. Se aplicó una solución de 50 mg de nitrógeno y 10 mg de fósforo por kilo de suelo a partir de NH_4NO_3 y KH_2PO_4 respectivamente. Las plantas se mantuvieron en el invernadero de Abril a Julio para dar tiempo al establecimiento de la asociación y a que el micelio externo se desarrollara en el compartimiento lateral.

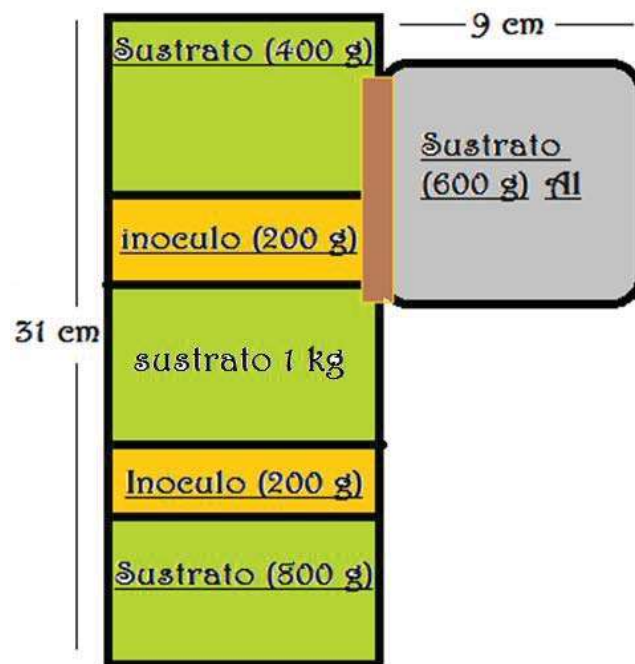


Figura 6. Demostración de la forma como se llevo la inoculación de los diferentes inóculos de HMA y los niveles de aluminio. Se muestra como la inoculación se llevo en dos niveles.

VI.4 Cosecha y análisis

Transcurridos tres meses las plantas se cosecharon de la siguiente manera: Los sistemas de crecimientos se colocaron en un lugar amplio, al ser estos tan grandes y pesados lo primero que se obtuvo fueron los tallos de las plantas de maíz que se cortaron con tijeras y fueron colocados en sobres de papel numeradas para secarlas. Posterior a eso se retiró la parte lateral del sistema, se retiro la malla de nylon y el suelo fue mezclado de manera homogénea, se

extrajo una muestra de suelo de 50 g la cual inmediatamente se colocó en el congelador a -20 °C. La raíz fue la parte más complicada, la cual estaba distribuida en la toda la zona del sistema de crecimiento, se colocó en el chorro de agua y se lavó hasta retirar la mayor cantidad del suelo posible y se escurrió para eliminar el exceso de agua, se tomó una muestra en fresco de 2 g para el análisis de colonización y el resto se colocó en bolsas de papel para llevarlas a secar.

VI.5 Colonización de los HMA.

Se midió el grado de colonización mediante la determinación de sus estructuras: vesículas, hifas, micelio y arbusculos. Una vez cosechadas las plantas a los tres meses se tomaron muestras de las raíces frescas de las 60 macetas, posteriormente fueron lavadas para eliminar cualquier exceso de suelo adherido y tenidas con la técnica de Phillips y Hayman (1970) con el colorante azul de tripano. Este método consiste en calentar las raíces en KOH al 10% durante 20 min a baño María, lavar con abundante agua y se acidificar con HCl al 1% durante 10 min. Una vez eliminado el HCl se adiciona una solución de azul de tripano en ácido láctico y glicerol y se mantienen nuevamente al baño María durante 10 minutos. Se elimina el exceso de colorante y las raíces se conservan en láctoglicerol hasta posterior observación. De esta forma se tiñen los componentes del hongo en el interior de la raíz permaneciendo esta sin colorearse.

El porcentaje de colonización fue determinado con el método de intersecciones de Giovanetti y Mosse (1980).

VI.6 Micelio micorrízico arbuscular

El micelio micorrízico arbuscular que se desarrolló en el compartimiento lateral fue cuantificado por medio de la técnica de Jakobsen *et al.*, (1992) que consiste en homogenizar cada muestra de suelo de cada tratamiento y pesar 2 g de suelo (dos repeticiones) mezclando con 250 ml de agua en la licuadora durante 30 segundos. Inmediatamente después se transfiere a un matraz Erlenmeyer con tapón. Se agita vigorosamente y se deja en reposo durante 60

segundos. Se toman dos alícuotas de 2 ml cada una y se transfiere por una membrana de nitro celulosa colocado en el aparato de filtración con vacío. Tras la filtración a vacío, se añaden 2 ml de azul de tripano al 0.1% y se deja en tinción durante 5 minutos. Los filtros se transfirieron a los portaobjetos y se dejaron secar. Para determinar la longitud de las hifas, se contaron en 25 campos de visión, todas las intersecciones entre la hifa y las líneas de un área cuadrículada de 1mm.

Utilizando la fórmula de Tennant (1975) se calculó la longitud de la hifa en los 25 campos de visión corrigiendo las diluciones y el contenido de humedad.

VI.7 Pesos secos de las plantas

Una vez cultivadas las plantas, estas se colocaron en una cámara de secado a 80 °C. Después de una semana se determinó el peso seco por medio una balanza analítica y una vez que estas presentaron un peso constante se determinó el peso seco de la parte aérea y las raíces.

VI.8 Microbiota asociada a la rizósfera.

Para la cuantificación de los microorganismos asociados a la hifósfera bajo las diferentes concentraciones de aluminio, el suelo de la parte lateral del sistema de crecimiento se homogeneizó y se tomó una muestra de 50 g que se mantuvo en el congelador a una temperatura aproximada de -20°C por un tiempo de tres semanas. Se aplicó la técnica de ácidos grasos de célula completa la cual se realizó bajo un procedimiento de cuatro pasos de acuerdo a Sasser (1990) las cuales son: extracción del suelo, fraccionamiento de lípidos, metanólisis alcalina y análisis por cromatografía de gases. Los ácidos grasos se identificaron según su tiempo de retención relativo a un estándar conocido y se cuantificaron en relación a los datos de área de los picos del resto de ácidos grasos en la muestra. Las cantidades relativas del pico de cada éster metílico de ácidos grasos se expresaron como porcentajes con respecto al área del pico de todos los esteres metílicos de los ácidos grasos. El ácido graso 16:1 ω 5 se utilizó para los HMA (Olsson, 1999), 18:2 ω 6,9 y 18:1 ω 9, para hongos

saprótrofos (Frostegard y Bååth, 1996; Larsen *et al.*, 1998) 15:0 iso, 14:0 iso, 16:0 iso, (Ravnskov *et al.*, 2006) 16:1ω7 (Bååth, 2003) para bacterias y 16:0 14 metil para actinomicetos (Ravnskov *et al.*, 2006).

VI.9 Concentraciones de fósforo y nitrógeno

Una vez determinado el peso seco del tallo de las plantas de maíz estas se molieron y se homogeneizó la muestra, se tomaron 5 g para la determinación de fósforo y nitrógeno. Para determinar el nitrógeno total la muestra se predigirió en sulfato de potasio y sulfato de cobre, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico, se deja reposar por 24 horas antes de la digestión. Se pone a digerir a 375°C durante 3 o 4 horas y se filtra el extracto con papel Whatman #1. El extracto es leído por medio de colorimetría en el autoanalizador (Jackson, 1982). El fósforo total también se determina con el método colorimétrico de Molibdato después de la reducción del ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962) y el procedimiento es similar al de nitrógeno total, con excepción de que la lectura se hace con una solución amortiguadora de ácido sulfúrico y cloruro de sodio. El cromógeno es una mezcla de molibdato de amonio y tartrato de amonio y potasio con ácido ascórbico para desarrollar el cromógeno.

VI.10 Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados usando un Análisis de Varianza de dos vías. Cuando las diferencias son significativas se realizaron comparaciones mediante la prueba de Tukey. Para el análisis de perfiles microbianos se llevó a cabo una Análisis de Componentes Principales (PCA). Se uso el programa estadístico JMP 8.0, SigmaPlot 10.0 y Microsoft Office Excel 2007.

VII. RESULTADOS

VII.1 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de aluminio sobre la colonización de los HMA asociados a la rizósfera de plantas de maíz

El grado de colonización varió con los tres inóculos pero no con las distintas cantidades de aluminio. (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de Probabilidad (P) a partir de análisis de varianza de porcentaje de colonización de raíces, con diferentes tipos de inóculos de HMA y distintos niveles de aluminio. *, <0,05; **, P<0.01; ***<0.001

ANÁLISIS DE VARIANZA	Valores de p
% de colonización	
Inóculo (A)	***
Niveles de aluminio (B)	0,6247
A*B	0,9351

El inóculo que menos porcentaje de colonización presentó fue el de la población nativa de suelo contaminado, mientras que *A. delicata* y *G. margarita* fueron las que exhibieron un porcentaje mayor, con vesículas, arbusculos y micelio (Fig. 7 y 8).

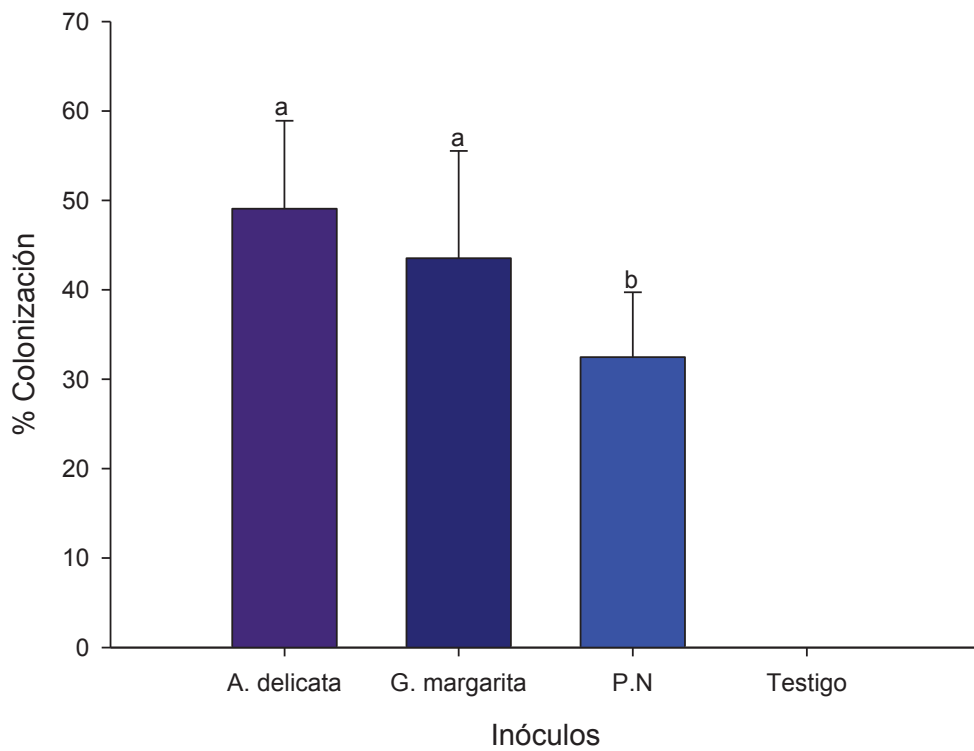


Figura 7. Promedios (\pm D.E., n=15) de los porcentajes de colonización micorrízica en las raíces en los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

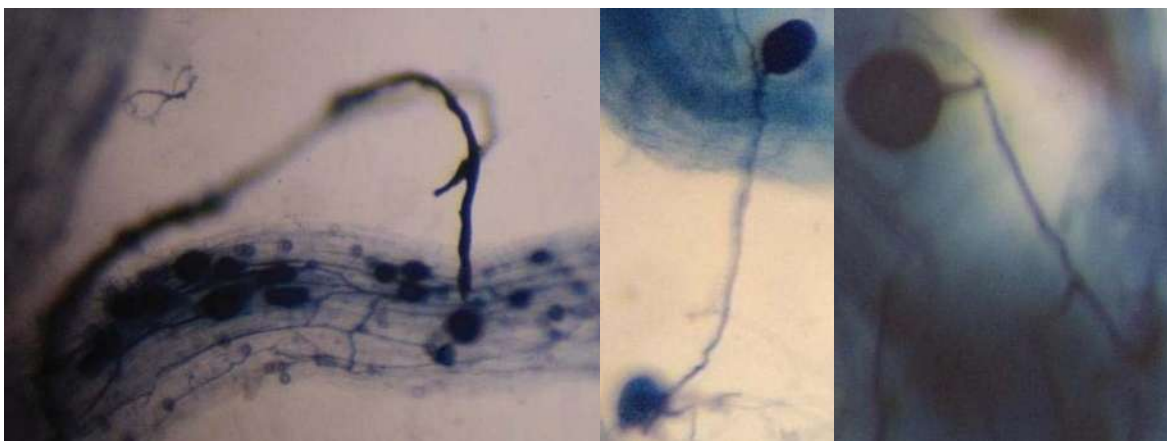


Figura 8. Estructuras observadas en las observaciones de colonización de los diferentes tratamientos de izquierda a derecha. Raíces colonizada con vesículas y micelio.

VII.2 Determinación del efecto de las diferentes concentraciones de aluminio sobre las plantas de maíz

El análisis de varianza indica que el factor que influyó significativamente en las variables de crecimiento de la planta fueron los inóculos (Tabla 3). El inóculo de población nativa produjo los valores más altos en altura, diámetro peso seco de tallo y raíz y biomasa total.

Tabla 3. Valores de probabilidad (*P*) del análisis de varianza de las variables referentes al desempeño vegetal de las plantas de maíz con los diferentes inóculos de HMA y los distintos niveles de aluminio como factores principales. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001

	ANALISIS DE VARIANZA			Valores de P	
	Peso seco raíz (g)	Peso Seco Tallo (log)	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Biomasa total (log)
Inóculo (A)	***	****	****	*	***
Niveles Al (B)	0,0742	0,2921	0,4690	***	0,2026
A*B	0,8729	0,0557	**	0,7277	0,1510

El inóculo que tuvo un efecto mayor sobre el peso de la raíz fue el de la población nativa del suelo contaminado (Fig. 9). Tanto las plantas inoculadas con *Acaulospora delicata* como el testigo presentaron un peso similar e intermedio, y el peso seco de la raíz de las plantas con el inóculo de *Gigaspora margarita* fue el más bajo. Se observó una tendencia a una disminución del peso de la raíz cuando las plantas estaban expuestas a 100 ppm de Al, aunque esta tendencia no fue significativa.

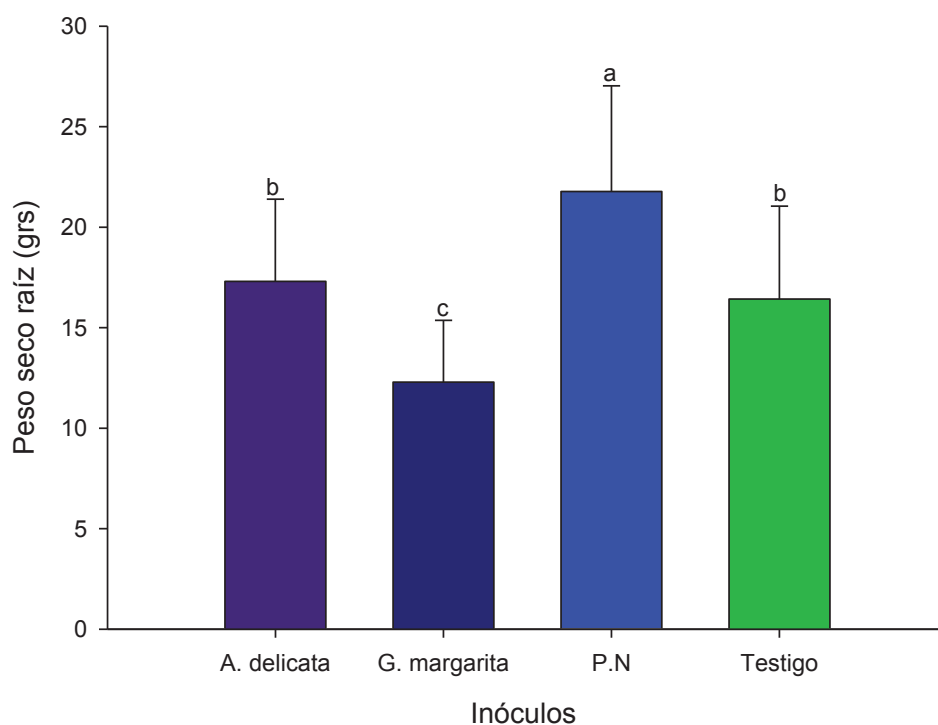


Figura 9. Promedios (\pm D. E., n=15) de los pesos de la raíz de las plantas de maíz de acuerdo con los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

Un caso similar se presentó para la variable de peso seco del tallo (Fig. 10) donde de igual forma las plantas con el inóculo de población nativa presentaron un peso del tallo significativamente mayor que el de las plantas con los inóculos de *A. delicata* y *G. margarita*, los cuales no se diferenciaron del testigo.

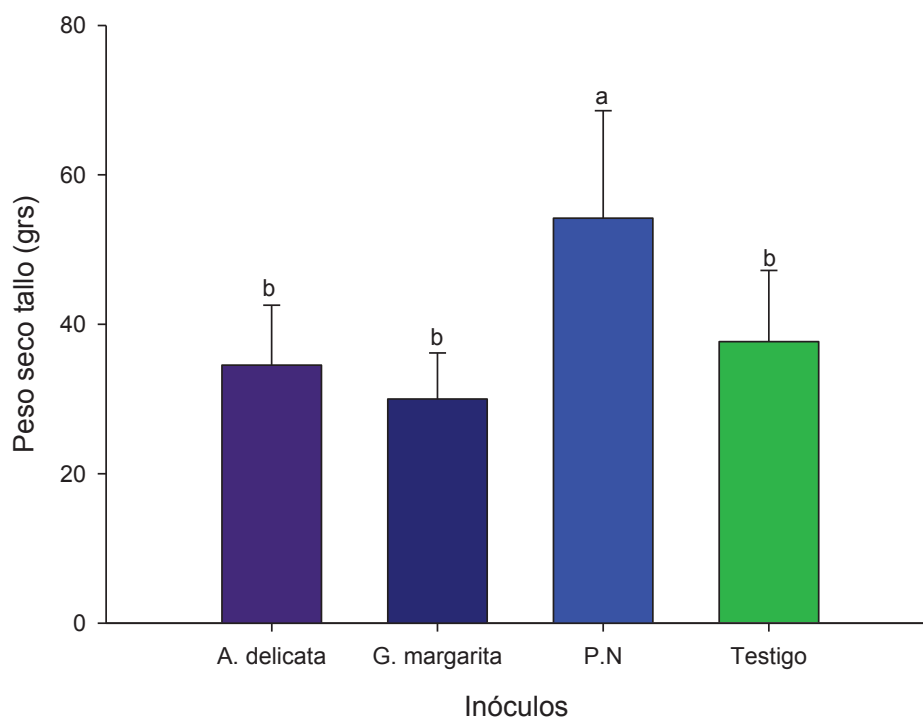


Figura 10. Promedios (\pm D.E., $n=15$) de los pesos secos de la parte aérea de las plantas con los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

La interacción entre los dos factores fue significativa ($p= 0,0107$) para la altura de las plantas (Fig. 11). El inóculo de la población nativa junto con el testigo presentaron las plantas de mayor altura, mientras que las plantas con el inóculo de *A. delicata* y *G. margarita* presentaron las plantas con menor altura. Las diferencias entre los tratamientos de inoculación fueron más marcadas con 0, y 50 ppm que con 100 ppm de aluminio.

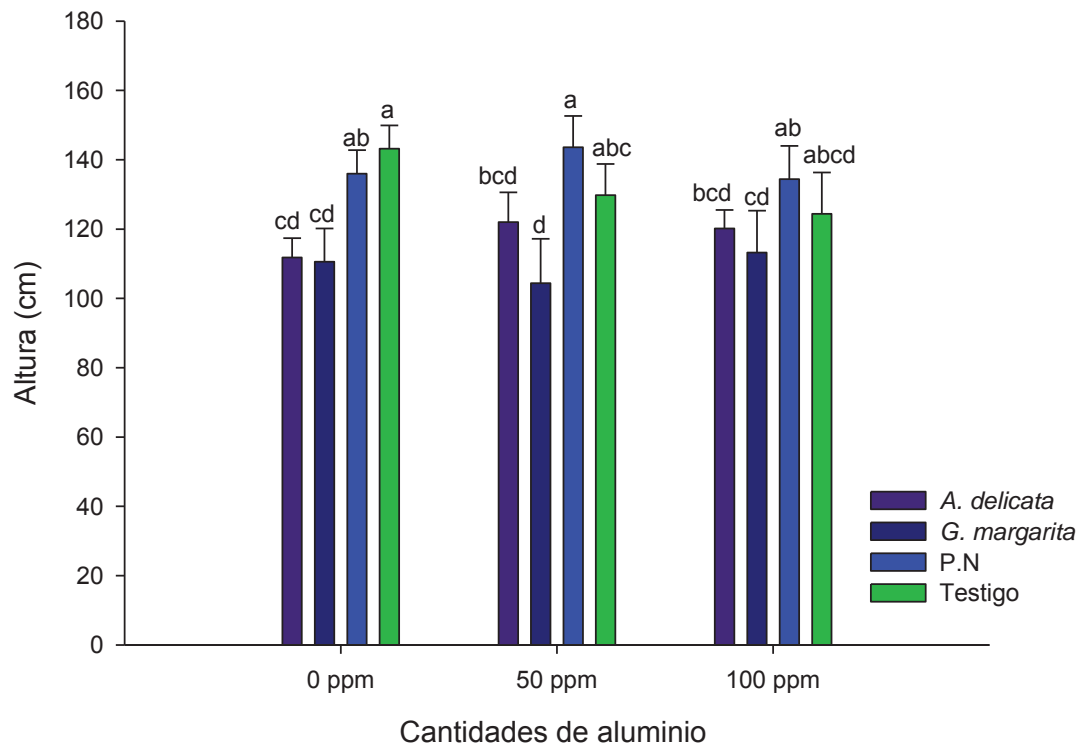


Figura 11. Promedios (\pm D.E., n=15) de altura de las plantas con los diferentes tratamientos, mostrando la interacción entre las dos variables. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

Se observaron diferencias muy pequeñas en el diámetro de los tallos. Los tratamientos con población nativa fueron los que presentaron un mayor diámetro, mientras que los tratamientos con *G. margarita* fueron los de menor diámetro. No obstante los tratamientos de inoculación con 100 ppm presentaron un menor diámetro con respecto a los de 0 y 50 ppm. (Fig. 12).

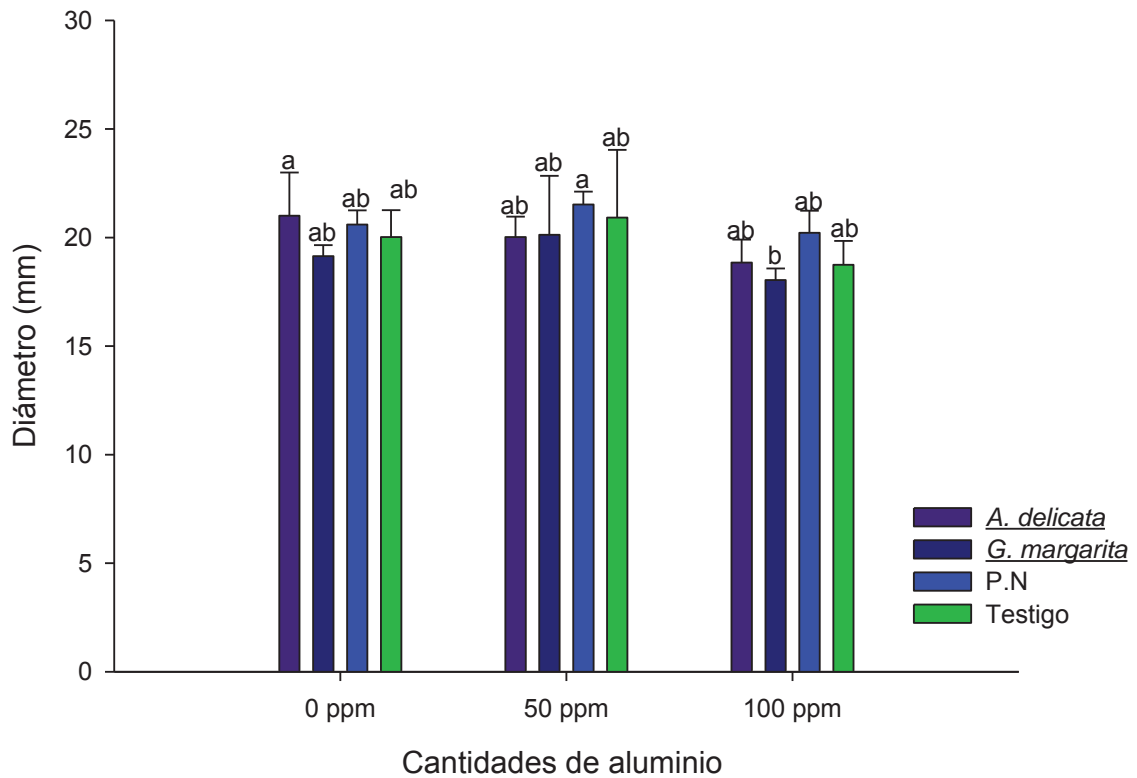


Figura 12. Promedios (\pm D.E., n=15) de diámetro de las plantas de los diferentes tratamientos con los dos factores combinados. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

Al comparar la biomasa total, el inóculo que produjo plantas con mayor peso fue el de población nativa, siendo el inóculo de *G. margarita* el que produjo plantas significativamente más pequeñas (Fig. 13).

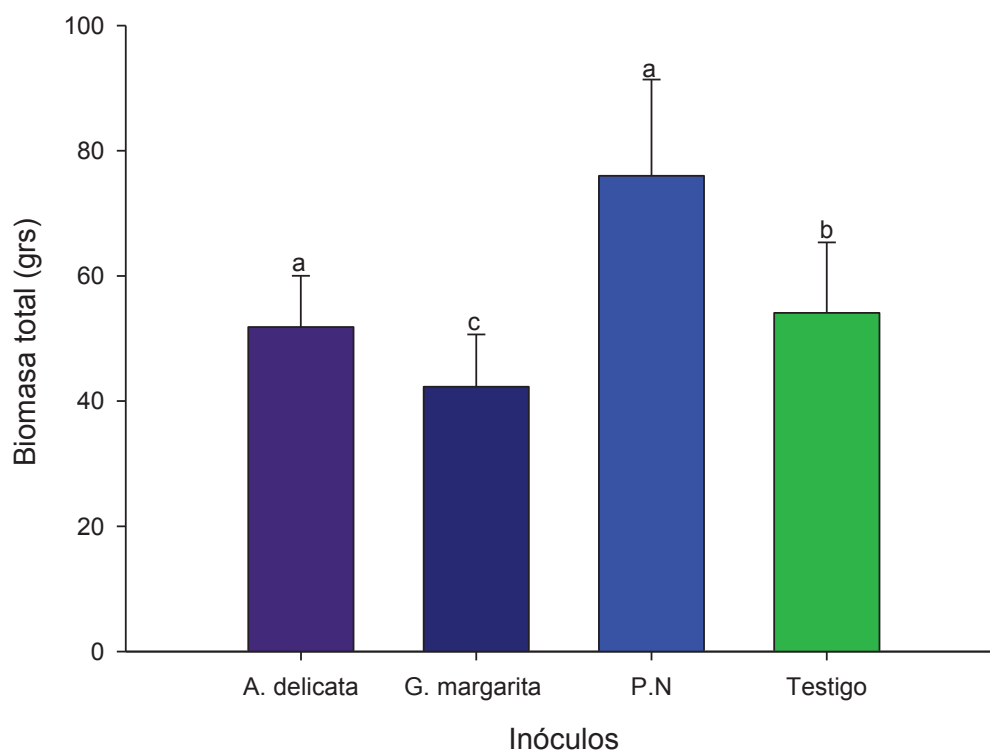


Figura 13. Promedios (\pm D.E., n=15) de la biomasa total de las plantas de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

VII.3 Concentración de fósforo y nitrógeno en las plantas de maíz en los diferentes tratamientos de aluminio e inoculación

La tabla 4 resume el análisis de varianza realizado para las concentraciones de fósforo y nitrógeno en las plantas de maíz de los diferentes tratamientos.

Tabla 4. Valores de probabilidad (*P*) a partir del análisis de varianza de la concentración de N y P en la parte aérea para conocer el estado nutricional de las plantas con distintos HMA y niveles de aluminio. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001

	ANALISIS DE VARIANZA	
	Nitrógeno (mgN/g)	Fósforo (mgP/g)
Inóculo (A)	***	****
Niveles Al (B)	0,5671	0,1869
A*B	0,5078	0,5890

Los inóculos de *A. delicata* y *G. margarita* se comportaron de igual forma que el testigo, presentando la mayor concentración de N en el tallo de las plantas, mientras que las plantas con la población nativa presentaron una menor concentración de nitrógeno (Fig. 14).

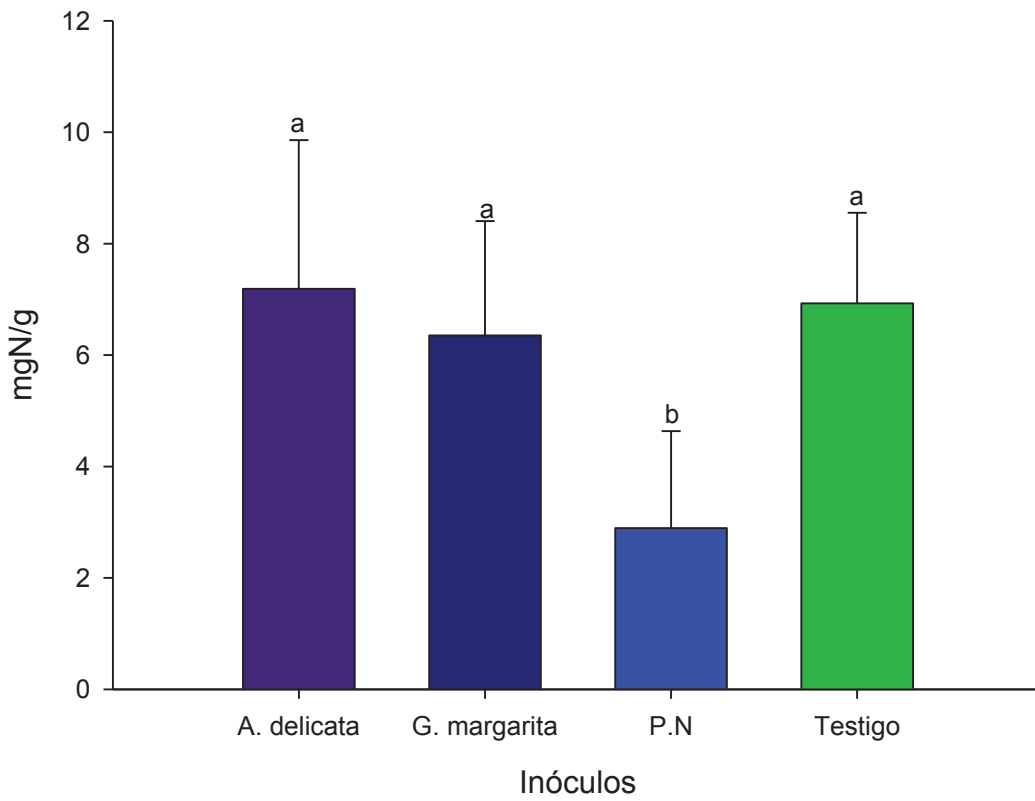


Figura 14. Promedios (\pm D.E., n=15) de la concentración de nitrógeno en el tallo de las plantas de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

Los inóculos de *A. delicata* y *G. margarita* presentaron la mayor concentración de fósforo y la población nativa presentó la menor concentración de fósforo junto con el testigo (Fig. 15).

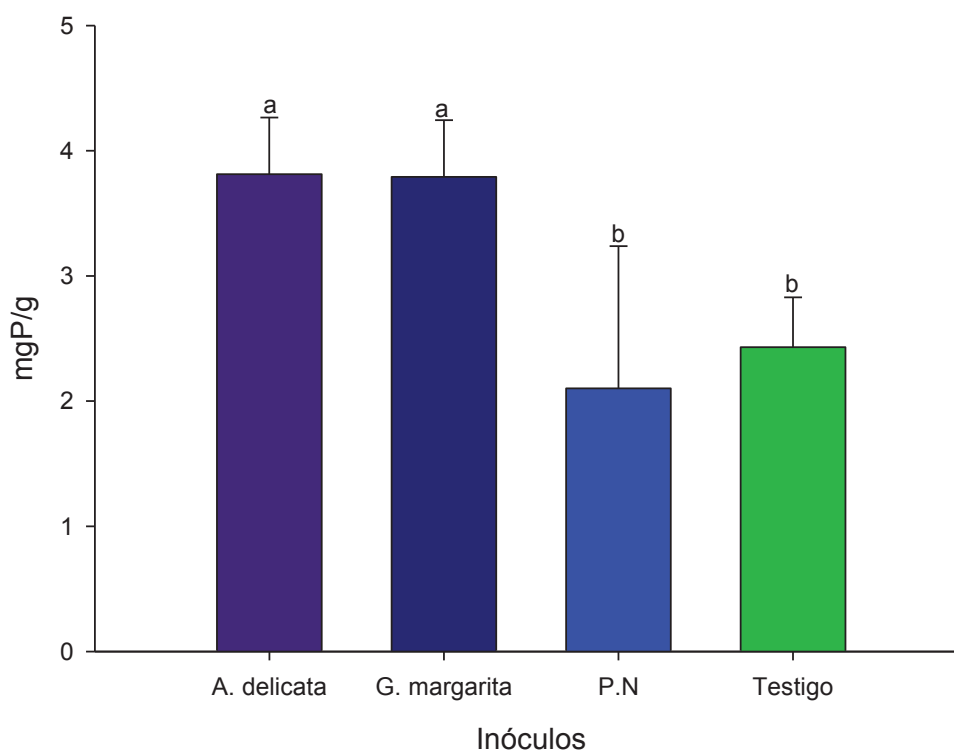


Figura 15. Promedios (\pm D. E., n=15) de la concentración de fósforo en el tallo de las plantas de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

VII.4 Cuantificación de la microbiota asociada a la hifósfera de las plantas de maíz bajo diferentes concentraciones de Aluminio en el suelo.

Con respecto a los HMA y los microorganismos asociados a la hifósfera, se reportan la abundancia del micelio de HMA y de los biomarcadores de ácidos grasos de los grupos funcionales microbianos con la finalidad de conocer que microorganismos se encontraban presentes en el compartimiento libre de raíces donde se colocaron las diferentes concentraciones de aluminio. El crecimiento de los HMA se midió tanto por extracción y microscopía como con un marcador de ácidos grasos. Los análisis de varianza muestran que las concentraciones de aluminio estudiadas no influyeron en el desarrollo del micelio de HMA o en la abundancia de los grupos microbianos (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de varianza de la densidad de micelio y la abundancia de los biomarcadores de ácidos grasos indicadores de los diferentes microorganismos en la hifósfera en los distintos tratamientos con HMA y niveles de aluminio. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

	ANALISIS DE VARIANZA			Valores de P		Estado
	Micelio de los HMA (cm/grs)	Actinomicetos 16:0 14 metil (moles/grs)	Bacterias (moles/grs)	HMA 16:1ω5 (moles/grs)	Hongos saprófitos (moles/grs)	fisiológico de los HMA (NLFA 16:1ω5/PLFA 16:1ω5)
Inóculo (A)	***	****	****	***	***	**
Niveles Al (B)	0,7171	0,4563	0,8929	0,8929	0,4195	0,7143
A*B	0,4639	0,5048	0,3497	0,3497	0,1147	0,2333

El inóculo de *A. delicata* fue el inóculo que más cantidad de micelio presentó, seguido de *G. gigantea*, mientras que el inóculo de población nativa fue el de menor desarrollo (Fig.16).

Las cantidades de micelio desarrollado en los diferentes tratamientos con inóculos fueron diferentes al testigo. Al analizar los tratamientos del testigo también encontramos presencia de algún micelio, porque aunque el suelo estaba esterilizado, el micelio de hongos nativos muere pero no se degrada completamente y parte de él puede aparecer en las extracciones del suelo. El micelio medido en los testigos se restó de los valores medidos en los otros tratamientos para corregir este micelio residual.

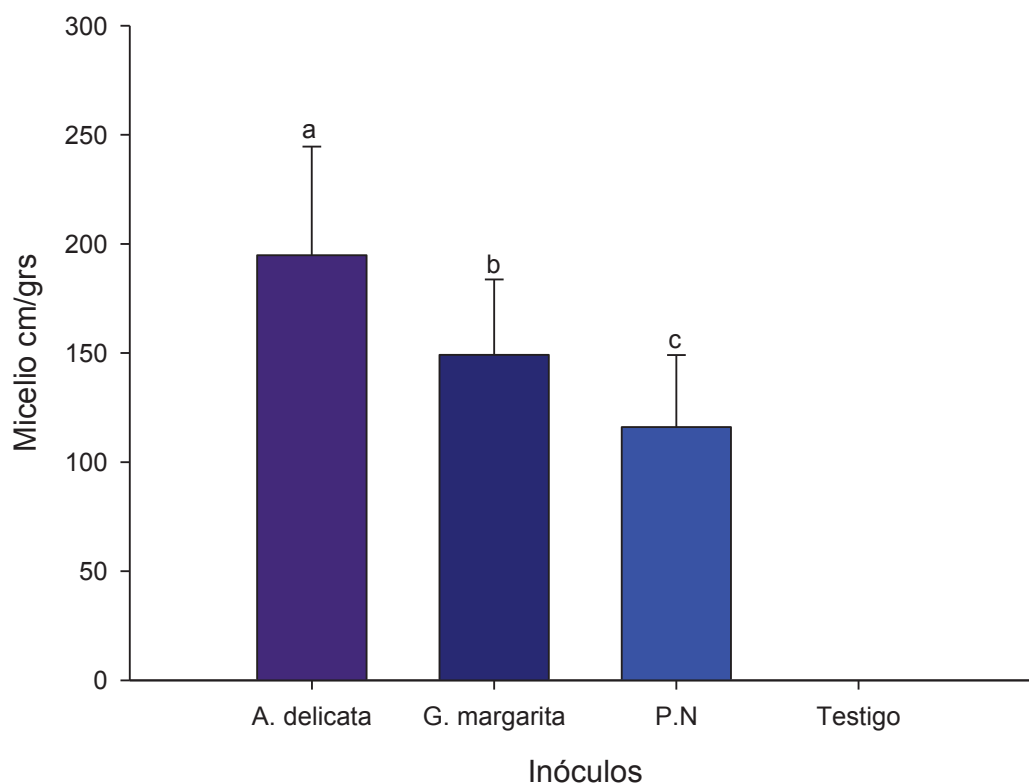


Figura 16. Promedios (\pm D. E., n=15) de la densidad del micelio de los HMA en el suelo del compartimiento lateral de los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

La Figura 17 muestra que el inóculo de *A. delicata* fue el inóculo que presentó mayor abundancia de actinomicetos mientras que el testigo fue el que presentó la menor cantidad.

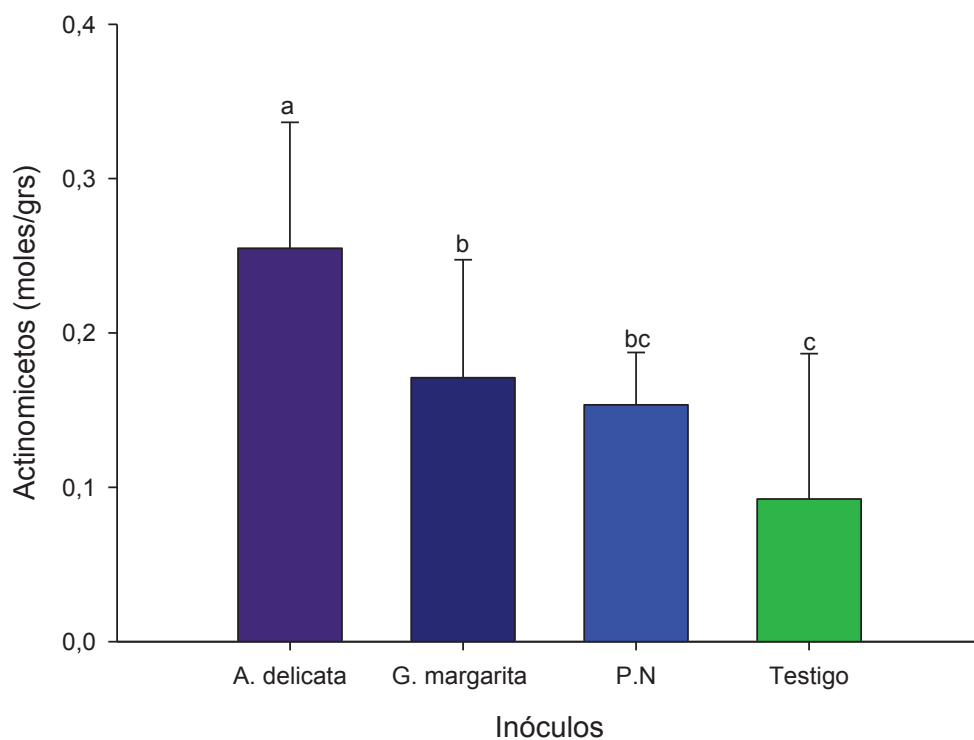


Figura 17. Promedios (\pm D. E., n=15) de la abundancia de los biomarcadores de actinomicetos asociados a la hifosfera en los diferentes tratamientos de inoculación. Las letras diferentes arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

En cuanto a las bacterias, nuevamente el inóculo de *Acaulospora delicata* fue el inóculo con mayor cantidad de bacterias, seguido de *Gigaspora margarita*, población nativa y por último el testigo (Fig 18).

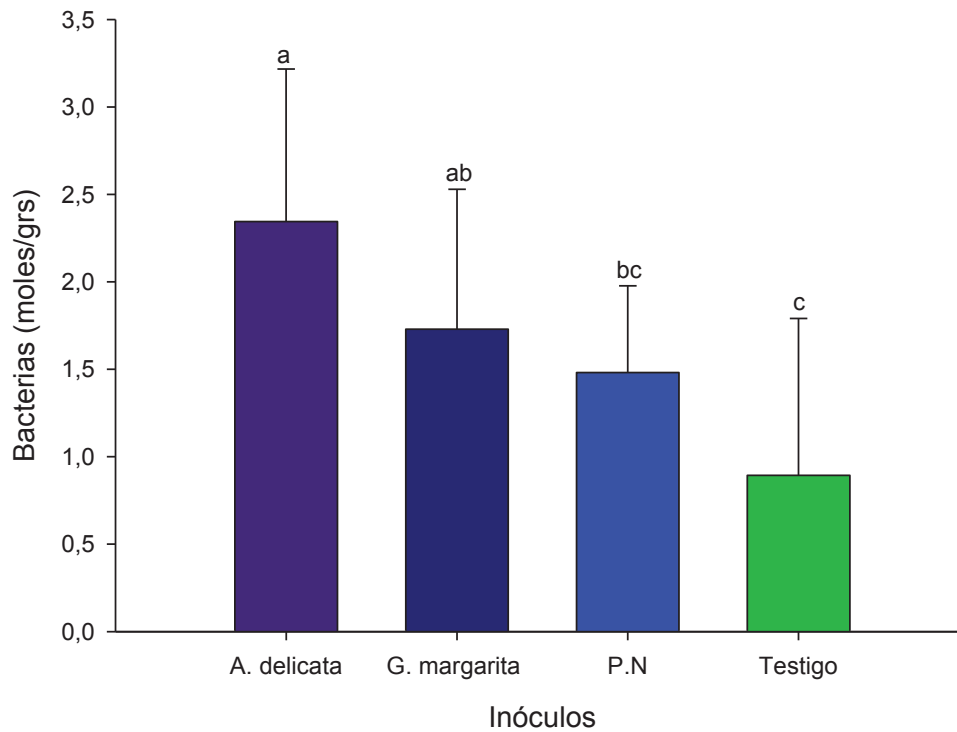


Figura 18. Promedios (\pm D.E., n=15) de la abundancia de los biomarcadores de bacterias asociadas a la hifósfera de los HMA de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

El testigo fue el que presentó menor cantidad de hongos saprófitos, el inóculo de *A. delicata* presentó la mayor abundancia, mientras que *G. margarita* presentó niveles intermedios junto con la población nativa (Fig. 19).

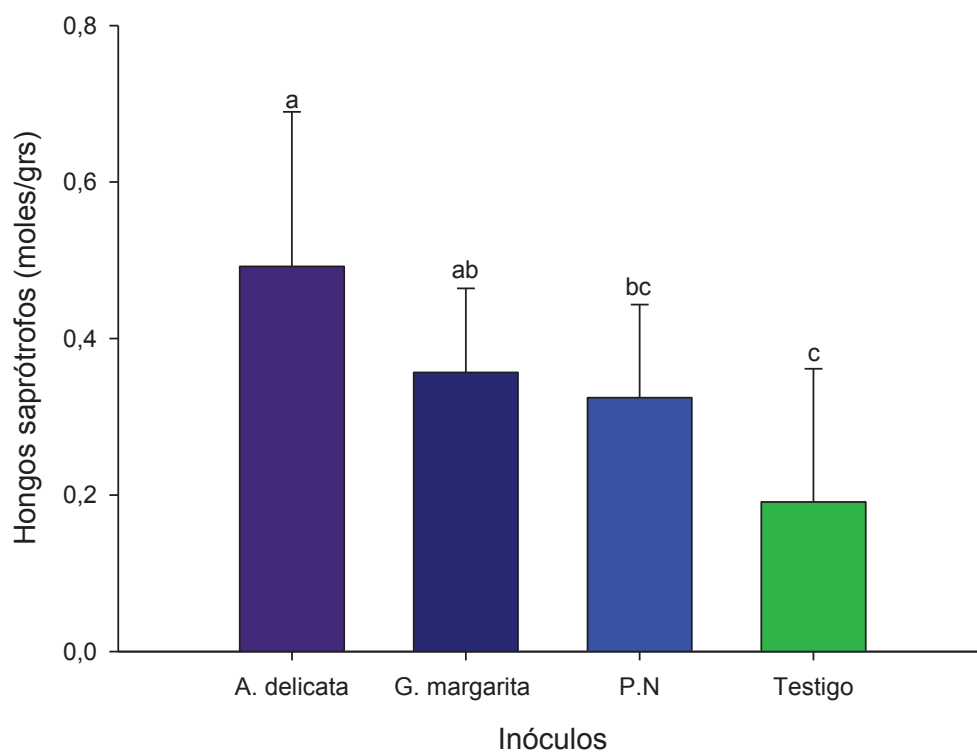


Figura 19. Promedios (\pm D.E., n=15) de la abundancia de los biomarcadores de hongos saprótrofos encontrados en la hifósfera de los HMA con los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

El inóculo con *A. delicata* presentó mayor abundancia del biomarcador de HMA y *G. margarita* y la población nativa presentaron cantidades menores que estadísticamente no fueron diferentes entre sí (Fig. 20).

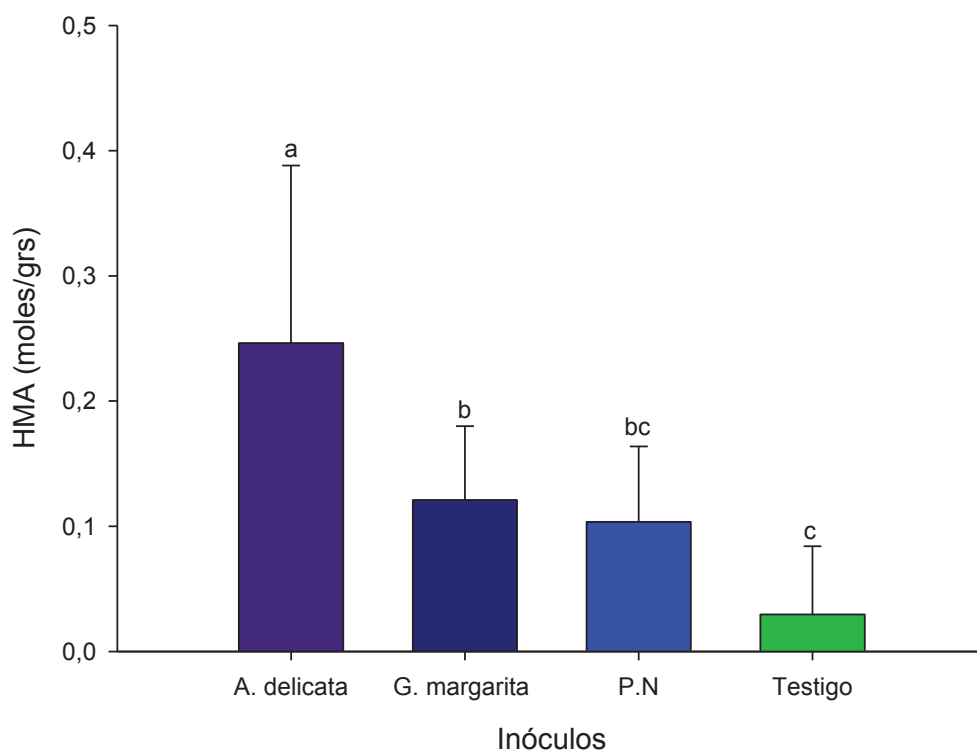


Figura 20. Promedios (\pm D.E., n=15) de la abundancia de los biomarcadores de HMA encontrados en la parte lateral del sistema diseñado de acuerdo a los diferentes tratamientos de inoculación. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

Por otro lado se midió la relación entre la abundancia del ácido graso neutro 16:1 ω 5 y el ácido graso fosfolipídico 16:1 ω 5 (NLFA 16:1 ω 5/PLFA 16:1 ω 5) para explorar el estado fisiológico de los HMA. *G. margarita* es el inóculo con mayor relación NLFA/PLFA, indicándonos que es el hongo con mayor grado de almacenamiento de ácidos grasos de reserva; mientras que los inóculos de *A. delicata* y población nativa se comportaron de forma similar y mostraron una relación más baja (Fig. 21).

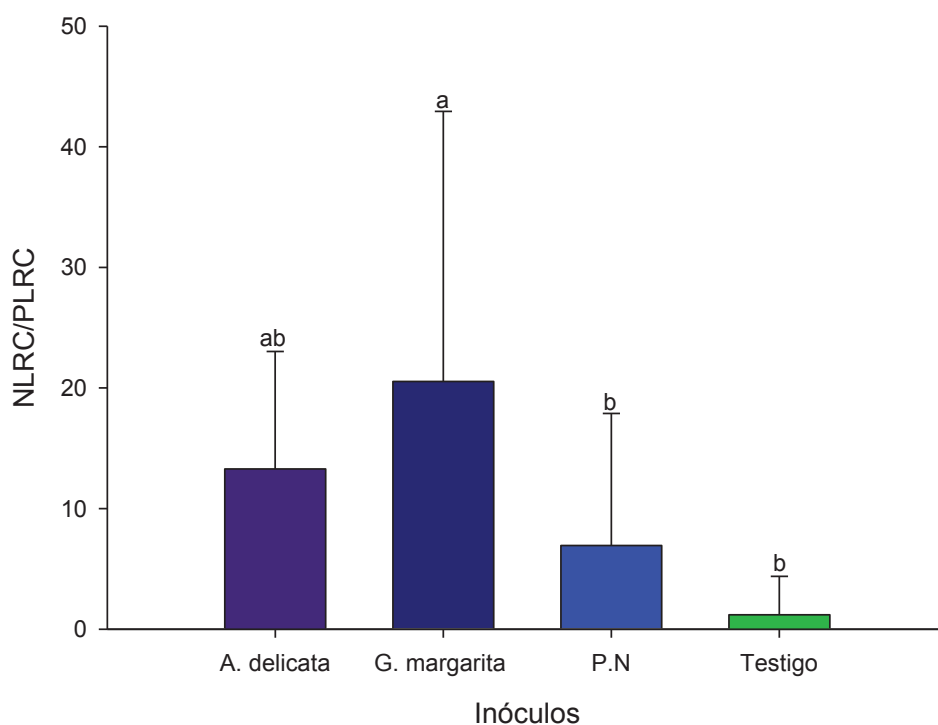


Figura 21. Promedios (\pm D.E., n=15) del cociente de la abundancia de los biomarcadores ácido graso neutro y ácido graso fosfolipídico (NLFA/PLFA) 16:1 ω 5 para determinar el estado fisiológico de los HMA. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos.

El conjunto de datos de ácidos grasos microbianos también fue sometido a un análisis de componentes principales (PCA) (Fig 22) para explorar si se separaban los tratamientos en función del conjunto de marcadores de grupos microbianos y si había algún marcador que diferenciara a alguno de los tratamientos.

Se puede observar en el análisis que los componentes 1 y 2 explicaron respectivamente un 77% y un 13% de la varianza en los datos; es decir la mayor parte. En el componente 1 es posible ver una clara separación entre los tratamientos de los diferentes inóculos que ubica al tratamiento testigo en un grupo separado al centro con los niveles más bajos de todos los marcadores microbianos (círculo punteado rojo) y al tratamiento con *Acaulospora delicata* con las mayores abundancias de grupos microbianos y a los tratamientos inoculados con *G. margarita* y el suelo contaminado en una zona intermedia.

Sin embargo entre los diferentes niveles de aluminio no hubo una evidente diferenciación. Los biomarcadores de ácidos grasos 18:2 ω 6,9, 18:1 ω 9, 16:1 ω 7 y 14:0 ISO los cuales corresponden a bacterias y a hongos saprótrofos y son los que mejor explican el componente 1.

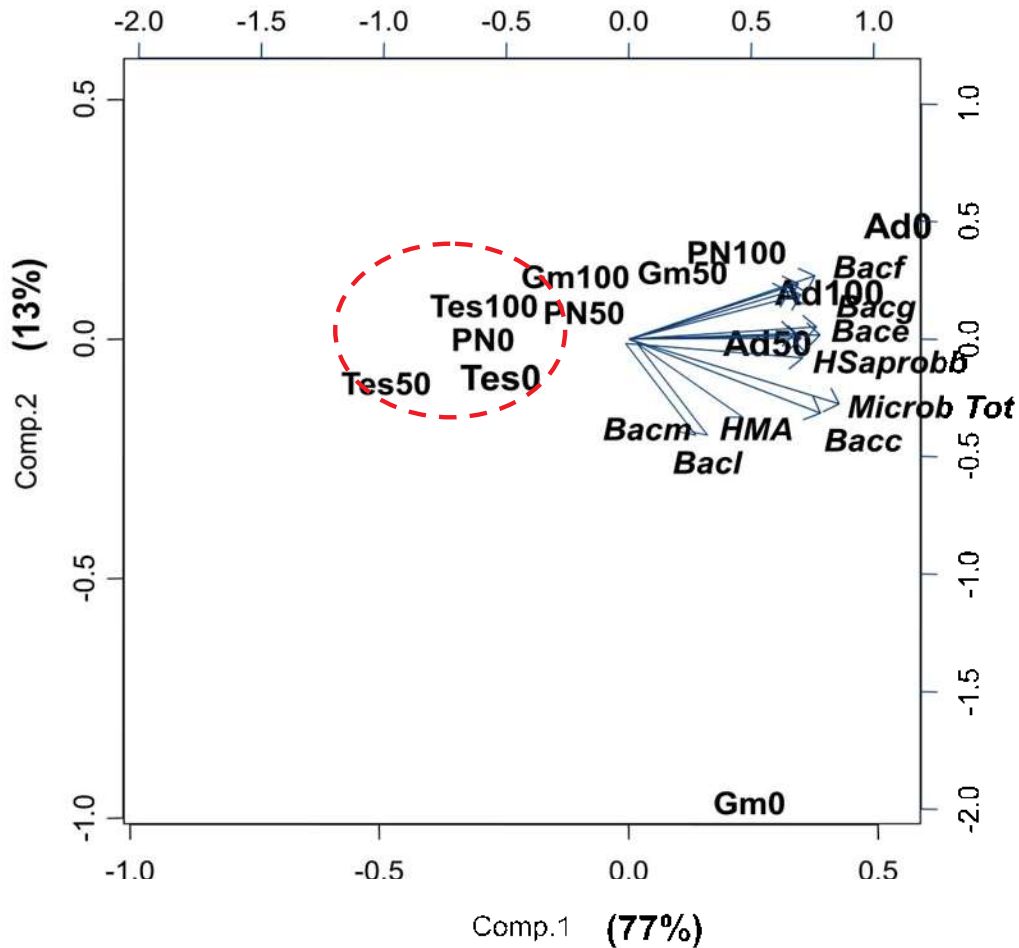


Figura 22. Análisis de componentes (PCA) de los perfiles de ácidos grasos microbianos obtenidos a partir del análisis del conjunto de lípidos celulares extraídos del suelo con los diferentes tratamientos con los tres inóculos (abreviados como **Tes**=testigo, **Ad**=*Acaulospora delicata*, **Gm**=*Gigaspora margarita* y **PN** =población nativa de suelo contaminado con Al) y los niveles de aluminio (indicados después de la abreviatura del inóculo, como 0, 50 y 100 ppm Al). El resto de los vectores es una selección de los biomarcadores más importantes en la definición de estos grupos e indican: **Bac**=bacterias, **HSaprob**=Hongos saprótrofos, **HMA**=Hongos micorrízicos arbusculares, **Microb Tot**=Microbios totales. Si había más de un marcador de cada grupo microbiano se indica con letras a, b, c, etc.

VIII. DISCUSIÓN

Se utilizaron diferentes inóculos de HMA con el objetivo de hacer una comparación de cómo estos microorganismos actúan frente a situaciones de estrés cuando son nativos de un suelo que ya presentaba contaminación y aquellos que no tenían este tipo de adaptación.

En general, los resultados nos indican que concentraciones de hasta 100 ppm de aluminio no alteraron el crecimiento de las plantas de maíz a las que únicamente pudo haber llegado al ser transportado a través del micelio micorrízico, ni el crecimiento de los HMA en las raíces y en el suelo. Sería conveniente examinar niveles de aluminio más altos en estudios posteriores para de esta forma poder conocer a que niveles los hongos se ven afectados y cuáles son los métodos de respuesta. En este estudio, el suelo utilizado no permitió incrementar más la concentración de aluminio sin ocasionar una reducción fuerte del pH, lo cual se evitó en lo posible para no mezclar el efecto del cambio de pH con la toxicidad del aluminio.

Esta diferenciación es importante porque se sabe que los cambios de pH alteran el desarrollo de los HMA (Van Aarle *et al.*, 2002) y por lo tanto es necesario no confundirlos. Dado que la toxicidad de aluminio va muy asociada a la acidificación del suelo, separar los dos componentes hubiera sido prácticamente imposible de haberse utilizado un suelo ya contaminado y por lo tanto con pH ácido.

La adición de aluminio con mínima alteración del pH a un suelo sin la toxicidad desarrollada demostró que este elemento en sí no resultó tan tóxico y los niveles estudiados no produjeron ningún efecto, ni en las plantas, ni en los HMA, ni en los microbios hifosféricos. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en el laboratorio. Se observó incluso un efecto positivo del incremento de aluminio en el medio de cultivo de un estudio realizado *in vitro* (Méndez-Sántiz, 2009), sobre el desarrollo del micelio de *Glomus intraradices*, donde se controló el pH, pero se observó también que a una concentración de aluminio de 20 Molar, las raíces ya mostraban reducciones importantes de

crecimiento. De igual manera, en otro estudio realizado con el mismo suelo que se usó en este estudio, pero poniendo en contacto con el aluminio tanto a las raíces como a los HMA, se encontró que el desarrollo del maíz se vio más afectado que el de los HMA por concentraciones de hasta 200 ppm Al. En ese estudio se observó, sin embargo, que la colonización intraradical de la población nativa del suelo contaminado pudo desarrollarse mejor al ir aumentando el Al que otras cepas no expuestas previamente al aluminio.

Curiosamente, en otro estudio realizado en el suelo contaminado con Al que se usó como inoculante en el presente trabajo, también se crecieron las plantas directamente en el suelo contaminado y no se vio ningún efecto en el crecimiento del maíz cuyo crecimiento fue vigoroso y saludable tanto en suelo estéril como en suelo fresco (Herrera-Villaseñor, 2007). Sin embargo el pH de ese suelo tipo vertisol es más bien neutro, lo cual apoya la observación de estos trabajos que sugiere que en ausencia de reducciones fuertes del pH los HMA pueden tolerar altos niveles de aluminio.

En la actualidad se han comenzado a realizar varios estudios con respecto al funcionamiento de los microorganismos del suelo frente a estrés por metales, sin embargo hasta el momento no se conoce del todo como es este mecanismo. No obstante la mayoría de estos estudios son enfocados en la planta y pocos a los microorganismos en sí.

Por un lado los hongos micorrízicos arbusculares alteran la absorción de los metales por las plantas, en algunos caso mejoran la toma y en otros caso reducen la toma. Por ejemplo Cumming y Ning (2003) encontraron que los HMA confieren resistencia al aluminio a *Andropogon virginicus* L. reduciendo la toma de aluminio y translocación en plantas hospedadas, mientras que Dosskey y Andriano (1993) muestran que los HMA facilitan la toma de zinc en pepino creciendo en carbono. La respuesta de las plantas a la micorrización combinada con la exposición a metales tóxicos varía con la especie de plantas, comunidad de hongos, condiciones bióticas y abióticas, concentración de toxicidad y pH. Esto demuestra que la compleja interacción involucra muchas variables (Taheri y Bever, 2010). Una de ellas puede ser que las micorrizas

pueden explorar de manera eficiente el volumen de suelo y, debido a su pequeño tamaño que les permite entrar a microsítios que no son accesibles para las raíces de las plantas. Esto puede modificar la biodisponibilidad de contaminantes en varias maneras, incluyendo competencia con las raíces y otros microorganismos para absorción de agua y toma de contaminantes, protegiendo a la raíz de una interacción directa con el contaminante (Wenzel, 2009).

Sin embargo pocos estudios han examinado la respuesta que tienen los hongos a la exposición con metales y muchos menos al incremento del aluminio. Hasta el momento está claramente conocido que la asociación de los hongos micorrízicos con las raíces de las plantas alteran la interacción planta-suelo y mejora el crecimiento de las plantas bajo condiciones de estrés edáfico (Kelly *et al.*, 2005; Klugh y Cumming, 2007; Giovannetti *et al.*, 1994), de la misma forma se conoce que las especies de HMA no tienen especificidad en la elección de sus hospederos. Sin embargo, diferencias en los efectos que las especies de HMA causan sobre el crecimiento de los individuos de especies vegetales, indican que éstas responden a especies específicas de HMA y consecuentemente, hay un aumento en la diversidad y productividad de las plantas en un ecosistema determinado (Barrer 2009; Kobayashi *et al.*, 2010). De esta forma el rendimiento de una planta hospedera depende en gran medida del tipo de HMA al que se encuentre asociado (Kobayashi, *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2005).

Se ha observado que la respuesta de las plantas colonizadas no siempre es benéfica llegando a variar de negativa, a neutral o positiva dependiendo de las especies de plantas y especies de hongos así como de las condiciones del medio ambiente, como disponibilidad de nutrientes del suelo, intensidad de luz y temperatura. Dichas variaciones de respuesta responden en algunos casos a las estrategias de la toma de adquisición de fósforo por diferentes hongos (Jansa *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010)

Klironomos (2003), confirma que existe una alta variabilidad en la respuesta del crecimiento de una planta en la presencia de diferentes HMA; en un estudio que lleva a cabo entre plantas y hongos nativos y exóticos indica

que la respuesta de crecimiento en un ecosistema puede tener un rango de altamente parasitario a mutualista. La respuesta fue mayor cuando se utilizaban plantas y hongos nativos, mientras que las respuestas parasitarias y mutualistas fueron también detectadas cuando usaban plantas y genotipos de hongos no locales donde la gama de respuesta se redujo significativamente al igual que la frecuencia de respuestas positivas.

En este estudio se pudo observar algo similar; de los inóculos utilizados hubo diferencias significativas en el rendimiento de las plantas de maíz, observando que las plantas inoculadas con la población nativa del suelo contaminado presentaron una mayor biomasa y altura, seguido del inóculo de *A. delicata* y el inóculo de menor rendimiento fue el de *G. margarita* el cual se comportó de manera similar con el testigo.

Al llevar a cabo el analizar de porcentaje de colonización, no se pudo correlacionar el grado de colonización con la biomasa vegetal ya que precisamente las plantas que presentaron mayor colonización de la raíz y tuvieron mayor concentración de P en las hojas fueron las de menor biomasa vegetal. Hay que recordar que estas variables no pudieron ser afectadas con las cantidades de aluminio colocadas ya que el aluminio solo fue colocado en la parte lateral del sistema diseñado, por lo cual nunca estuvieron en contacto directo con el aluminio.

A menudo se piensa que los HMA aumentan la biomasa de las plantas a través de un aumento de la capacidad de fósforo para la planta y la cantidad de este debe estar relacionada con la cantidad de colonización de las raíces por HMA (Van Der Heijden *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 2009). Sin embargo se ha encontrado también que algunos HMA, como *Scutellospora calospora*, a menudo son poco eficientes en el transporte de fósforo a la planta huésped. Estas variaciones pueden ser por el resultado de diferencias en la colonización de la raíz o características fisiológicas, pero la habilidad de diferentes aislados de hongos para producir diferentes cantidades de micelio también puede ser de importancia. Los efectos positivos de los HMA sobre el crecimiento de las plantas a menudo se han relacionado a un aumento de la captación de

nutrientes menos móviles, especialmente el fósforo de las regiones del suelo que no son accesibles a los pelos radicales de la raíz (Van Arle *et al.*, 2002) pero en este estudio no se vio esa relación de la biomasa con la captación de P.

Sin embargo curiosamente el contenido de fósforo y nitrógeno por la planta no fue reflejada en la biomasa vegetal lo cual estuvo determinado por la cantidad de micelio. Esto es una de las primeras evidencias directas de complementariedad funcional entre HMA y una planta en relación con la adquisición de fósforo entre HMA y una planta como lo que sugiere Koide (2000)

Por otro lado al colocar el suelo de la población nativa como inóculo no sabíamos cuantos tipos de hongos o cuales hongos estaban presentes por lo cual esta contribución de mayor biomasa y menor contenido de P y N por parte de la planta de maíz pudo estar dada por toda la interacción de microbiota que estaba presente. El hecho de que el inóculo del suelo contaminado con Al tuviera el mayor efecto sobre el crecimiento del maíz sugiere que hubo algo en la microbiota acompañante que promovió su desarrollo, ya que no se encontró evidencia de que este efecto se debiera a mejoras nutricionales por parte de los HMA.. Es probable que algún componente de la microbiota sea el responsable de esta promoción del crecimiento, lo cual se podría explorar inoculando las plantas con un filtrado de este suelo sin propágulos micorrízicos

Lo que si fue claramente relacionado fue el grado de colonización con la extensión del micelio de los hongos ya que *A. delicata* y *G. margarita* que fueron los inóculos con mayor porcentaje de colonización fueron precisamente los que tuvieron una mayor extensión de micelio, mientras que el inóculo de población nativa fue el de menor colonización y el de menor cantidad de micelio.

Se conoce que la red externa de hifas de los HMA juega un importante rol en la nutrición de las plantas, como en la entrada de nutrientes minerales por su capacidad de influencia más allá de la zona de la raíz, lo cual es facilitado por la propagación del micelio (Albertsen *et al.*, 2006). Esto podría

explicar el contenido de fósforo y nitrógeno que contenía el tallo de las plantas, se encontró que las plantas inoculadas con *A. delicata* y *G. margarita* presentaron mayor cantidad de fósforo; mientras que para el caso de nitrógeno nuevamente *A. delicata* y *G. margarita* fueron las de mayor cantidad, la población nativa y el testigo se comportaron de la misma forma.

Además de los HMA las raíces de las plantas interactúan con diversas poblaciones de microorganismos del suelo que tienen implicaciones para el crecimiento y nutrición de las plantas. Los nutrientes del suelo son transferidos hacia la superficie de la raíz a través de la rizósfera, o en tal caso a la asociación de la raíz asociada con HMA, a través de la micorizósfera (Richardson et al. 2009).

Para este estudio se determinó por medio de ácidos grasos la presencia de la microbiota en la zona de influencia del micelio (hifósfera), con el objetivo de ver su comportamiento al aumentar el aluminio. La cantidad de estos microorganismos varió con los diferentes inóculos, aumentando considerablemente en los tratamientos de inoculación a diferencia del testigo, lo cual evidencia que los HMA promueven el crecimiento microbiano independientemente de la presencia de las raíces. El inóculo de *A. delicata* fue el de mayor cantidad seguido de *G. margarita*, mientras que la población nativa fue la de menor cantidad. Sin embargo de todos los microorganismos las bacterias fueron las que más predominaron, mientras que los hongos saprófitos, actinomicetos y HMA se mantuvieron en cantidades similares. Se observó que el aumento de las cantidades de aluminio no afectó la presencia de estos microorganismos.

Kothari et al. (1990) reportaron efectos de la inoculación con el hongo formador de micorriza arbuscular *Glomus mosseae* en maíz y de su interacción con organismos rizoféricos. Atribuyeron el incremento en la concentración y en la acumulación de P, Zn y Cu en tejidos aéreos y radicales de la planta a la actividad directa del HMA, en tanto que su interacción con los microorganismos rizoféricos afectó la adquisición de otros nutrimentos, en algunos casos con incrementos y en otros con decrementos, cuya causa se atribuyó a la alteración

de la morfología del sistema radical. Los microsimbiontes pueden modificar su rango de compatibilidad funcional con la planta hospedera en función de diversas variables, por ejemplo la propia especie vegetal, el tipo y calidad del sustrato, el ambiente de crecimiento y el manejo que recibe el sistema. Un factor determinante de la promoción del crecimiento por microorganismos inoculados es la combinación genotípica específica de planta y microorganismos (Robles y Barea, 2004).

Aunque hay numerosos estudios referentes a las interacciones de los HMA y rizobacterias, asociaciones entre HMA y actinomicetos se conocen escasamente, por lo que se requieren investigaciones que permitan la confirmación experimental adicional sobre actividades y mecanismos relacionados (Franco-Correa, 2009).

Los HMA interactúan con varios grupos de bacterias (Albertsen *et al.*, 2005), ya que estos proveen un nicho específico como las esporas, hifas y micelio para poblaciones de bacterias (Bharadwaj *et al.*, 2008). El crecimiento del micelio externo mejora las actividades bacterianas. Las bacterias se han encontrado adheridas a las hifas de los HMA, así como incrustado en las paredes de las esporas. Las bacterias que se adhieren al micelio de pueden alimentarse de los exudados de hifas y/o utilizar el micelio como un vehículo para la colonización de la rizósfera (Mansfeld-Giese *et al.*, 2002).

Varios estudios reportan una interacción de los HMA y las bacterias asociadas con su fase extraradical y la existencia de bacterias endocelulares, las cuales viven dentro de ciertos aislados de hongos. Los diferentes tipos de asociaciones que se producen entre los HMA y bacterias, dependen de las especies y cepas. La composición de poblaciones de bacterias en la micorrizósfera ha sido afectada por la competencia por nutrientes, la estructura del suelo y exudados de la raíz de la planta y el micelio extraradical de los HMA (Parkash *et al.*, 2008). Es quizás por ello que en el inóculo que desarrolló mayor cantidad de micelio contuvo de igual forma mayor cantidad de bacterias y microbios en general por proporcionarles un mayor nicho ecológico para interactuar.

Por otro lado también se ha encontrado que las bacterias promueven el crecimiento de los HMA, aislados de esporas de especies de *Glomus*, muestran estimulación a la germinación de esporas y formación de micorrizas. Además la elongación y ramificación de hifas de *Gigaspora margarita* demostró ser más alto cuando albergaba bacterias *Candidatus* Glomeribacter gigasporarum, indicando que estas bacterias mejoran el crecimiento pre simbiótico de los HMA. Las bacterias de vida libre y endosimbióticas promueven el establecimiento de las micorrizas por el aumento de contacto con los hongos y la colonización de las raíces del hospedero (Pivato *et al.*, 2009).

Los resultados nos muestran la importancia de conocer más acerca de los microorganismos de la rizósfera y su interacción. Podemos observar la amplia gama de respuesta que estos llegan a tener, y el conocer mejor el mecanismo será una herramienta a nuestro favor, para ser aplicada en diversos ecosistemas agrícolas.

IX. CONCLUSIONES

Concentraciones de hasta 100 ppm de aluminio no alteraron el crecimiento de las plantas de maíz ni de los microorganismos asociados. Con lo cual es conveniente en estudios posteriores aumentar las concentraciones.

El inóculo con que dio mayor crecimiento a las plantas de maíz fue el inóculo de población nativa del suelo contaminado. Sin embargo el inóculo que presento mayor cantidad de microorganismos asociados fue el de *Acaulospora delicata*.

X. REFERENCIAS

- Albertsen A, Ravnskov S, Green H, Jensen D, Larsen J, 2006. Interactions between the external mycelium of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and other soil organisms as affected by organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1008-1014
- Allen MF. 2007. Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone J* 6:291–297.
- Artursson V, Finlay RD y JK Jansson. 2005 Combined bromodeoxyuridine immunocapture and terminal restriction fragment length polymorphism analysis highlights differences in the active soil bacterial metagenome due to *Glomus mosseae* inoculation or plant species. *Environmental Microbiology* 7:1952-1966.
- Artursson V, Finlay RD y JK Jansson. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8(1):1-10.
- Azcón-Aguilar C y JM Barea. 1992. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. In *Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant–Fungal Process*. Allen, M.J. (ed.). New York, USA: Routledge, Chapman & Hall, pp. 163–198. influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* 19:81-90
- Bååth E. 2003. The Use of Neutral Lipid Fatty Acids to Indicate the Physiological Conditions of Soil Fungi. *Microbial Ecology* 45: 373-383.
- Barea JM, Azcón R y C Azcon-Aguilar. 2004. Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. *Plant surface Microbiology* 351-371.
- Barea JM, Pozo MJ, Azcón R y C Azcón-Aguilar. 2005. Microbial Co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56 (417): 1761-1778.
- Batista GR y RA Sánchez. 2009. Fitorremediación de metales pesados y microorganismos. *Medio ambiente y Desarrollo* 9 (16): 1683-8904.
- Bentivenga SP y JB Morton. 1995. A monograph of the genus *Gigaspora* incorporating developmental patterns of morphological characters. *Mycologia* 87:720-732.
- Bharadwaj DP, Lundquist PO, Persson P, Alström S. 2008. Evidence for specificity of cultivable bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungal spores. *FEMS Microbiol Ecology* 65:310-322.

- Bossio DA, Scow KM, Gunapala H y KJ Graham. 1997. Determinants of Soil Microbial Communities: Effects of Agricultural Management, Season, and Soil Type on Phospholipid Fatty Acid Profiles. *Microbial Ecology* 36:1-12.
- Buée M. 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* 321:189-212.
- Chen X, Tang J, Zhi G, Hu S. 2005. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. *Applied Soil Ecology* 28: 259-269.
- Clark RB. 1997. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mine al acquisition at low pH. *Plant and soil* 192: 15-22.
- Cumming JR, Swiger TD, Kurnik BS y DG Panaccione. 2001. Organic acid exudation by *Laccaria bicolor* and *Pisolithus tinctorius* exposed to aluminum in vitro. *Can. J. For. Res.* 31:703–710.
- Cumming J y Ning J. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance aluminium resistance of broomsedge (*Andropogon virginicus* L.). *Journal of Experimental Botany.* 54, 1447-1459.
- Del Val C, Barea JM y Azcón A. 1999. Diversity of arbuscular micorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and environmental microbiology* 65(2): 718-723.
- Dosskev MG. y DC Adriano. 1993. Tracer element toxicity in VA mycorrhizal cucumber & own on weathered coal fly ash. *Soil Biology. Biochemistry.* 25:1547-1552.
- Dupré de Boulois H, Voets L, Delvaux B, Jakobsen I, Declerck S. 2006. Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* Under *in vitro* conditions . *Environmental Microbiology* 8(11): 1926-1934.
- Franco-Correa M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización . *Rev. Peru. Biology* 16(2):239-242.
- Frostegard A y E Bååth. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22:59–65.
- Gerdeman JW Y TH Nicolson. 1963. Spores of Mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46: 235-244.

- Giannakoula A, Moustakas M, Syros T, Yupsanis T. 2010. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. *Environmental and Experimental Botany*. 67: 487-494.
- Giller KE, Witter E y SP Mcgrath. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology Biochemistry* 30 (10): 1389-1414.
- Giovannetti M y Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Giovannetti M y V Gianinazzi-Pearson. 1994. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycology Res* 98:705–710.
- González-Chávez MA. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra latinoamericana*. 23 (1): 29-39.
- Guadarrama CP y GI Sánchez. 2004. Hongos y plantas beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares. *Ciencia* 13: 38-44.
- Herrera-Villaseñor MC. 2006. Evaluación del potencial de uso de microorganismos del suelo para biorremediación y mejoramiento del crecimiento vegetal en suelos contaminados con aluminio. Tesina Técnico Superior Universitario, Universidad Tecnológica de Morelia.
- INVAM. 2006. Internacional Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungy. <http://invam.caf.wvu.edu>. (12 de agosto del 2012)
- Jackson. 1982. Análisis químicos de suelos. 4ª edición. Ed. Omega. Barcelona.
- Jakobsen I, Abbott LK y AD Robson. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L.2. Hyphal transport of ³²P over defined distances. *New Phytologist* 120, 509–516.
- Jansa J, Smith FA y SE Smith. 2007. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi?. *New Phytologist* 177: 779-789.
- Johansson F, Paul L y R Finlay. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture *FEMS Microbiology Ecology* 48:1-13.
- Kelly CN, Morton JB y JR Cumming. 2005. Variation in aluminum resistance among arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 15:193-201.

- Hiltner L. 1904. Über neue erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie. Arbeiten der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft 98: 59–78.
- Klironomos JN. 2003. Variation in plant response to native and exotic Arbuscular mycorrhizal fungi . Ecology 84(9):2292-2301.
- Klugh KR y JR Cumming. 2007. Variations in organic acid exudation and aluminum resistance among arbuscular mycorrhizal species colonizing *Liriodendron tulipifera*. Tree Physiology 27:1103-1112.
- Kobayashi GH An S, Enoki H, Sonobe K, Muraki M, Karasawa, Ezawa T. 2010. How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasms. Plant Soil 327:441-453.
- Koide RT. 2000. Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 147: 233–235.
- Kothari SK, Marschner H y V Römheld. 1990. Direct and indirect effects of VA mycorrhizal fungi and rizosphere microorganisms on acquisition of mineral nutrients by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. *New Phytol.* 116: 637-645.
- Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsch A. 2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil.* 304: 35-44 pp.
- Larsen J, Olsson PA y I Jakobsen. 1998. The use of fatty acid signatures to study mycelial interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the saprotrophic fungus *Fusarium culmorum* in root-free soil. *Mycological Research* 102, 1491–1496.
- Mansfeld-Giese K, Larsen J y L Bodker. 2002. Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiology Ecology* 41: 133-140.
- Méndez-Sántiz Y. 2009. Efecto del aluminio sobre el crecimiento y desarrollo de *Glomus intraradices* cultivado *in vitro*. Tesis licenciatura Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Montaño NM, Camargo-Ricalde SL, García-Sánchez R, Monroy A. 2007. Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems). Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT,

- Mundi-Prensa SA de CV, UAM Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. Distrito Federal, México. 460 pp.
- Morgan JAW, Bending GD y PJ White. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere *Journal of Experimental Botany* 56(417):1729-1739.
- Murphy J. y J Riley. 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Analogy. Chemistry. Acta*, 27: 31-36.
- Olsson PA. 1999. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 303-310.
- Parkbask BD, Lundquist P-O, Persson P, Sadhna A. 2008. Evidence for specificity of cultivable bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungal spores. *FEMS Microbial Ecology* 65: 310-322.
- Paz IE y M Sánchez. 2007. Relación entre la longitud de micelio externo de hongos micorrízico y algunas propiedades del suelo bajo dos sistemas de sombrero en café, meseta de popayán, Colombia. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 5(1):1-6
- Phillips JM y Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougél C, Tuinen D. 2007. *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist*. 176: 197-210.
- Pivato B, Offre P, Marchelli S, Barbonaglia B, Mougél C, Lemanceau P, Berta G. 2009. Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as .
- Raaijmakers J, Paulitz T, Steinberg C, Alabouvette, Moëne Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 329:341-361.
- Ravnskov S, Jensen B, Knudsen B, Bodker L, Jensen DF, Karlinski, Larsen J. 2006. Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 38:3453-3462.

- Richardson AE, Barea JM, Mcneill AM, Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305-339.
- Robles C y JM Barea. 2004. Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *Glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. *TERRA Latinoamericana* 22(1):59-69.
- Sanders FE, Tinker PB, Black RL, y SM Palmerley. 1977. The development of endomycorrhizal root systems. I. Spread of infection and growth promoting effects with four species of vesicular–arbuscular mycorrhizae. *New Phytologist* 78:257–268.
- Sanon A, Andrianjaka ZN, Prin Y, Bally R, Thioulouse J, Comte G, Duponnois. 2009. Rhizosphere microbiota interferes with plant-plant interactions. *Plant Soil* 321:259-278.
- Sasser M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: Clement, Z., Rudolph, K., Sands, DC (Eds.), *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiadó, Budapest, pp. 199-204.
- Saucedo-Correa G. 2011. Efecto del aluminio sobre diferentes inóculos de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de maíz (*Zea mays*). Tesis licenciatura Universidad Tecnológica de Morelia.
- Smith SE y DJ Read. 1997. *Mycorrhizal symbioses*. Second edition. Academic Press, London, U.K
- Smith SE, Christophersen HM, Pope S, Smith A. 2010. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. *Plant soil* 327:1-21.
- Taheri WI y JD Bever. 2010. Adaptation of plants and arbuscular mycorrhizal fungi to coal tailings in Indiana. *Applied. Soil Ecology* 1374:1-6
- Tennant D. 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *Journal of Ecology* 63: 995-1001.
- Van Aarle I, Olsson PA y Söderström B. 2002 Arbuscular mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization. *New Phytol* 155, 173–182.
- Van der Heijden MG, Boller Thomas, Wiemken A, Sanders IR. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are Potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79(6):2082-2091.

- Van der Heijden MGA, JN Klironimos, M Ursic, P Moutoglis, R Streitwolf-Engle, R Boller, A Weimken y IR Sanders. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- Van der Heijden EW. 2001. Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens* . *Mycorrhiza* 10:185-193.
- Walker C, Pfeiffer CM y HE Bloss. 1986. *Acaulospora delicate* sp. nov. -- an endomycorrhizal fungus from Arizona. *Mycotaxon* 25:621-628.
- Wenzel WW. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant soil* 321:385-408.
- Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 487-511.
- Wright, S. y A. Upadhyaya. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198: 97-107.
- Wu F, Moreno J y R Vela. 1987. Growth of *Azoter vinelandii* on Soil Nutrients. *Applied and Environmental Microbiology*. 489-494.