



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

**DINÁMICA DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS Y FILOSFÉRICOS DE  
*Annona diversifolia* Saff. COMO RESPUESTA A LA ESTACIONALIDAD, FENOLOGÍA  
Y DEFOLIACIÓN EN EL TRÓPICO SECO**

**JAZMÍN CORTÉS SARABIA**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO  
2008**

La presente tesis titulada: **Dinámica de microorganismos rizosféricos y filosféricos de *Annona diversifolia* Saff. como respuesta a la estacionalidad, fenología y defoliación en el trópico seco**, realizada por la alumna: Jazmín Cortés Sarabia, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA

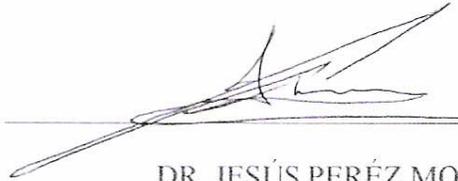
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR



DR. JESÚS PERÉZ MORENO

ASESOR



DR. GUSTAVO BALLESTEROS PATRÓN

ASESOR



M. EN. C. JULIÁN DELGADILLO MARTÍNEZ

Montecillo Texcoco, México, abril 2008

DINÁMICA DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS Y FILOSFÉRICOS DE *Annona diversifolia* Saff. COMO RESPUESTA A LA ESTACIONALIDAD, FENOLOGÍA Y DEFOLIACIÓN EN EL TRÓPICO SECO

Jazmín Cortés Sarabia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

**Resumen general**

La ilama es una planta frutícola tropical, cuya distribución se encuentra restringida a México, Centroamérica y parte de Sudamérica y cuyo cultivo es de importancia local. Dado el escaso conocimiento sobre la dinámica microbiana en este tipo de cultivo, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la estacionalidad, fenología y defoliación sobre la dinámica poblacional microbiana en filósfera y rizosfera de plantas de ilama (*Annona diversifolia* Saff.), en campo e invernadero. Se evaluaron plantas de tres edades en cuatro épocas del año en San Antonio de las Huertas, Guerrero. Se evaluaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos, actinomicetos, bacterias totales así como bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes a los grupos de *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Beijerenckia* spp. y *Derxia* spp. Se utilizaron medios de cultivo específicos para cada grupo microbiano. La evaluación de colonización micorrízica se realizó utilizando la técnica de clareo y tinción, el conteo de esporas se realizó siguiendo la técnica de extracción de Gerdemann y Nicolson. Las poblaciones bacterianas fueron mayores en épocas con precipitación en comparación con las épocas de sequía. La defoliación afecta negativamente la colonización micorrízica total en plantas de ilama independientemente de la edad. La mayor colonización micorrízica total, se presentó en épocas con mayor precipitación. El mayor número de esporas en plantas de campo e invernadero se encontraron en plantas defoliadas en comparación con las no defoliadas. Sería conveniente desarrollar trabajos sobre la influencia de factores tales como cambios microambientales en: pH, contenido nutrimental y temperatura en las poblaciones simbióticas de ilama. Adicionalmente, estudios taxonómicos de los diferentes grupos microbianos funcionales asociados en plantas de ilama.

**Palabras claves:** bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias solubilizadoras de fosfatos, fenología, estacionalidad, defoliación, micorriza arbuscular.

DYNAMICS MICROORGANISM OF RHIZOSFHERIC AND PHYLOPLANE OF *Annona diversifolia* Saff. AS RESPONSE TO THE SEASONALITY, PHENOLOGY AND DEFOLIATION IN THE DRY TROPIC

Jazmín Cortés Sarabia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

**General abstract**

The ilama plant is a tropical fruit, whose distribution is restricted to Mexico, Central America and some parts of South America and whose cultivation is of local importance. Given the limited knowledge related with their microbial symbiont. This study aimed to assess the effect of seasonality, phenology and defoliation on the population dynamics in phyllosphere and rhizospheric microbial communities in plants of ilama (*Annona diversifolia* Saff.) in field and greenhouse. We evaluated three age plants in four seasons in San Antonio de las Huertas, Guerrero. We evaluated the number of colony forming units of fungi, actinomycetes, bacteria and total nitrogen-fixing bacteria belonging to the groups of *Azospirillum* spp. *Azotobacter* spp. *Beijerenckia* spp. and *Derxia* spp. We used culture media for each specific microbial group. The evaluation of mycorrhizal colonization was carried out using the technique of clearing and staining, the spore count was conducted following the technique of extraction Gerdemann and Nicolson. The bacterial populations were higher at times with heavy rainfall compared to the times of drought. The defoliation negatively affects the total mycorrhizal colonization ilama regardless of plant age. The highest total mycorrhizal colonization, was found in the season with the highest precipitation. The largest number of spores in the field and greenhouse were found in defoliated plants compared with the non defoliated. It would be highly desirable to develop work on the influence of microenvironmental factors such as changes in pH, nutrient content and temperature on populations of symbiotic microorganisms of ilama. In addition, taxonomic studies of the different functional groups of microbial partners of ilama plants would be very convenient.

**Key words:** nitrogen-fixing bacteria, solubilizing phosphate bacteria, phenology, seasonality, defoliation, arbuscular mycorrhizae.

*Este trabajo esta dedicado a:*

*A ti mamá por apoyarnos incondicionalmente a mi hermana  
y a mí, y por ser la mejor, te amo.*

## **Agradecimientos**

A Dios por su gracia en todos mis logros, tanto profesionales como personales, y por darme y mantener a mis seres queridos.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar mis estudios de maestría.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno, por su amistad, enseñanza y apoyo para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Ronal Ferrera-Cerrato por su enseñanza e infraestructura y equipos, material de laboratorio para la realización del presente trabajo.

Al M. En C. Julián Delgadillo Martínez por su amistad y enseñanza para la realización del presente investigación.

A todo el personal del laboratorio de Fijación de Nitrógeno por su valiosa colaboración y apoyo en la realización del presente trabajo.

A mi madre Irma Sarabia Hernández y a mi abuelita Silvería Hernández Salgado por su amor incondicional y apoyo constante.

A toda mi familia que amo y admiro por todo el amor y apoyo.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
INDICE DE CUADROS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Las Anonáceas.....	3
2.1.1. La ilama.....	3
2.1.2. Aspectos botánicos.....	4
2.1.3. Etapas fenológicas.....	5
2.1.4. Requerimientos climáticos y edafológicos.....	6
2.1.5. Problemática del cultivo de la ilama.....	6
2.2. Los microorganismos rizosféricos.....	7
2.2.1. La micorriza arbuscular.....	7
2.2.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	9
2.2.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	10
2.2.4. Rizobacterias solubilizadoras de fosfato.....	11
2.3. Conclusiones de revisión de literatura.....	12
2.4. Literatura citada.....	12
CAPITULO 3. OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
3.3. Hipótesis general.....	19
3.4. Hipótesis específicas.....	19
CAPITULO 4. DINÁMICA DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR Y MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE <i>Annona diversifolia</i> Saff., COMO RESPUESTA A LA ESTACIONALIDAD Y DEFOLIACIÓN EN TRÓPICO SECO.....	20
Resumen.....	20
Abstract.....	21
4.1. Introducción.....	22
4.2. Materiales y métodos.....	23
4.2.1. Recolecta de material biológico en campo.....	23
4.2.1.1. Evaluación de hongos micorrízicos.....	24
4.2.1.2. Evaluación de microorganismos rizosféricos.....	24
4.2.1.3. Análisis estadístico.....	25
4.2.2. Experimento en vivero.....	25
4.2.2.1. Siembra de plantas y transplante.....	25
4.2.2.2. Variables evaluadas.....	26
4.2.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico.....	26

4.3. Resultados.....	29
4.3.1. Colonización micorrízica en campo.....	29
4.3.2. Poblaciones de microorganismos.....	29
4.3.3. Inoculación de cepas micorrízicas en invernadero.....	30
4.3.4. Contenido nutrimental en parte aérea y radical en plantas de ilama defoliadas y no defoliadas.....	30
4.4. Discusión.....	39
4.4.1. Efecto de la defoliación sobre la colonización micorrízica.....	39
4.4.2. Efecto de la estacionalidad sobre la colonización micorrízica.....	40
4.4.3. Efecto de la estacionalidad sobre la esporulación micorrízica en suelo rizosférico.....	41
4.4.4. Efecto de la defoliación sobre la biomasa radical.....	42
4.4.5. Contenido nutrimental en parte aérea y radical en plantas defoliadas y no defoliadas.....	43
4.5. Conclusiones.....	43
4.6. Literatura citada.....	44
CAPITULO 5. DINÁMICA POBLACIONAL MICROBIANA EN LA FILÓSFERA DE ILAMA ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.) EN HUERTO NATURAL DEL TRÓPICO SECO EN GUERRERO.....	48
Resumen.....	48
Abstract.....	49
5.1. Introducción.....	50
5.2. Materiales y métodos.....	51
5.2.1. Área de estudio.....	51
5.2.2. Muestreo en campo.....	51
5.2.3. Evaluación de microorganismos filosféricos (hojas) .....	52
5.2.4. Análisis estadístico.....	52
5.3. Resultados.....	53
5.3.1. Dinámica microbiana y estacionalidad.....	53
5.3.2. Dinámica microbiana y fenología.....	57
5.4. Discusión.....	57
5.4.1. Dinámica microbiana en hojas obovadas y pecioladas como respuesta a la estacionalidad.....	58
5.4.2. Dinámica microbiana en brácteas como respuesta a la estacionalidad.....	59
5.4.3. Dinámica microbiana en hojas y brácteas y fenología.....	60
5.5. Conclusiones.....	61
5.6. Literatura citada.....	62
CONCLUSIONES FINALES Y CONSIDERACIONES GENERALES.....	66
ANEXOS.....	67

## INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Contenido nutricional del fruto de <i>Annona diversifolia</i> .....	4
Cuadro 2. Frutales que establecen simbiosis con hongos micorrízico arbusculares (HMA). .....	8
Cuadro 4.1. Características físicas y químicas del suelo de San Antonio de las Huertas, Guerrero en el área de estudio y en el sustrato empleado en el experimento en vivero.....	27
Cuadro 4.2. Porcentaje de estructuras micorrízicas y de hongos endófitos y frecuencia de esporulación intrarradical en plantas de “ilama” ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.) de tres edades, en cuatro estadios fenológicos.....	31
Cuadro 4.3. Poblaciones de microorganismos aislados de rizosfera de plantas de “ilama” ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.) de tres edades, en cuatro estadios fenológicos.....	32
Cuadro 4.4. Poblaciones bacterianas fijadoras de nitrógeno de vida libre aisladas de rizosfera de “ilama” ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.) de tres edades, en cuatro estadios fenológicos.....	33
Cuadro 4.5. Efecto de la inoculación con hongos micorrízico arbusculares en el crecimiento, colonización y número de esporas y microorganismos rizosféricos de plantas de “ilama” ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.), crecidas en invernadero durante 22 semanas.....	34
Cuadro 4.6. Contenido nutrimental de la parte aérea y radical de “ilama” ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.), crecidas durante 22 semanas en invernadero, inoculadas con hongos micorrízico arbusculares.....	35
Cuadro 5.1. Poblaciones de microorganismos de filósfera de hojas obovadas y pecioladas de plantas de “ilama” ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.) de tres edades en tres estadios fenológicos.....	54
Cuadro 5.2. Poblaciones de microorganismos de filósfera de hojas semiredondeadas no pecioladas de plantas de “ilama” ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.) de dos edades en tres estadios fenológicos.....	55

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 4.1. Vistas generales del estudio efectuado en plantas de ilama ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.) de tres edades.....	28
Figura 4.2. Macromorfología y micromorfología de hongos de plantas de ilama.....	36
Figura 4.3. Estructuras micorrízicas y endofíticas en raíces de ilama ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.).....	37
Figura 4.4. Precipitación pluvial y temperaturas máximas y mínimas en Ciudad Altamirano, Guerrero.....	38
Figura 5.1. Microorganismos filosféricos (a-d) y rizosféricos (e-l) de plantas de ilama.....	56

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo fuente combinada de carbono (Rennie, 1980); para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.....	67
Anexo 2. Medio para bacterias solubilizadoras de fosfatos (Pikovskaya, 1948).....	67
Anexo 3. Medio de malato más rojo congo sólido para <i>Azospirillum</i> spp. (Paredes, 1988).....	68
Anexo 4. Medio agar papa glucosa más rosa de bengala para hongos totales (Beever y Bollard, 1970).....	68
Anexo 5. Medio NFB (Para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre) (Baldani <i>et al.</i> , 1986).....	68
Anexo 6. Medio LG (Lipman, 1903): <i>Beijerenckia</i> , <i>Derxia</i> y <i>Azotobacter</i> , para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. ....	69
Anexo 7. Efecto de la defoliación o herbívora en diferentes especies de plantas.....	70
Anexo 8. Morfología macroscópica de colonias bacterianas encontradas en la filósfera y rizosfera de ilama ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.).....	71
Anexo 9. Morfología microscópica de bacterias encontradas en la filosfera y rizosfera de ilama ( <i>Annona diversifolia</i> Saff.).....	71

# Capítulo 1

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La fruticultura mexicana a nivel mundial tiene amplia aceptación, principalmente en Europa y Estados Unidos de América quienes son los principales importadores. La demanda que hay en el mercado mexicano, se ha centrado principalmente en cuatro tipos de frutales tropicales: cítricos, mangos, plátanos y aguacates, los cuales son de mayor interés, dejando a un lado otros cultivos tropicales, que poseen gran potencial para su comercialización. México cuenta con gran variedad de microclimas que lo hace apto para producir una gran variedad de cultivos en demanda mundial (Calderón, 1989). En México no se han aprovechado los enormes recursos naturales con los que se cuentan, como es en el caso de la gran variedad de frutales tropicales, que tienen gran potencial para su exportación, y no han sido estudiados, ni comercializados. Como sucede con la familia de las Anonáceas, a las cuales se les ha dado poco interés, lo cual trae como consecuencia escasa información acerca de esta familia. Las especies con mayor comercialización y estudio dentro de las Anonáceas son chirimoya y guanábana (Vidal, 1983).

Hay especies de la familia de las Anonáceas con gran potencial para la producción frutícola, como la ilama (*Annona diversifolia* Saff.), la cual, es una especie nativa de México, Centro América y parte de Sudamérica de la que se conoce poco, y aún no se ha expandido como un cultivo comercial, además de considerarse como una planta básicamente de recolección, a pesar de que produce uno de los frutos más finos y con pulpa de excelente calidad (Palacios y Cano, 1997). Este fruto tiene gran aceptación comercial en el ámbito local. Lo cual, lo hace apto para su comercialización, así mismo, presenta limitantes para su producción, comercialización y exportación, debido a que es una planta esencialmente silvestre y por lo tanto, presenta características como dehiscencia que no es deseable para el consumidor (Evangelista-Lozano *et al.*, 2003). Por lo anterior, es necesario obtener más información acerca de este cultivo y conocer mejores técnicas para su manejo y producción. Estudios recientes se han enfocado a evaluar la efectividad de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la promoción del crecimiento en diversos frutales (Alarcón y Ferrera- Cerrato, 1999). Sin embargo, poco se ha estudiado sobre las aplicaciones de estos hongos micorrízicos en frutales de clima tropical. La aplicación de

microorganismos benéficos en fase de vivero es una alternativa viable para acortar su estancia en vivero. En otros estudios realizados con *Annona chirimoya* y *Annona muricata* se han obtenido buenos resultados (Jaen y Ferrera-Cerrato, 1989). Este trabajo tuvo como objetivo conocer las interacciones simbióticas que establece la ilama con los microorganismos rizosféricos y filosféricos. Asimismo, se planteó conocer el efecto de la defoliación, fenología y la estacionalidad sobre la dinámica de dichos microorganismos simbióticos.

## **Capítulo 2**

### **REVISION DE LITERATURA**

#### **2.1. Las Anonáceas**

El nombre de la familia es derivado del latín y significa “la cosecha es anual” (Rocha, 1965, citado por Ruiz y Alatorre, 1999). Los frutos están considerados como uno de los más finos y deliciosos, con gran aceptación en el mercado (Palacios y Cano, 1997). La familia de las Anonáceas esta conformada por 80 géneros, los cuales incluyen alrededor de 850 especies (Cantwell, 1979) estos géneros producen frutos comestibles como: *Annona*, *Rollinea*, *Uvaria* y *Asiminia* (Cañizarez, 1966). Más de 90% de las especies de anonas se encuentran localizadas en América tropical, por lo que se le considera a esta región como la principal diversificación y centro de origen de esta familia (González, 2003).

##### **2.1.1. La ilama**

La ilama (*Annona diversifolia* Saff.) es un árbol que alcanza una altura de 7 a 8 metros, es originaria de las tierras bajas y cálidas del sureste de México (Ochse *et al.*, 1965), aunque otros autores la consideran originaria de las montañas y cordilleras que se encuentran en el oeste de México y el cual, se extiende hasta el Salvador. Esta especie no se ha encontrado en altitudes mayores de 600 metros (Founque, 1972). En México se encuentra distribuida en Chiapas, Guerrero, Michoacán, estado de México, Sinaloa, Nayarit, Campeche, Oaxaca, Colima y Veracruz, también se ha localizado en Centroamérica y en los trópicos del viejo mundo por introducción más reciente. En algunos estados de la republica mexicana a la *Annona diversifolia* le llaman de diferentes nombres, ejemplo en el estado de Guerrero y estado de México los lugareños le llaman ilama, y papause en el istmo de Tehuantepec y Chiapas. Esta especie presenta gran aceptabilidad y consumo local en las regiones o zonas donde prospera considerablemente. En zonas como la región de Tierra Caliente del estado de Guerrero, los frutos de ilama son muy apreciados por la población. Se comercializan para su consumo en fresco, en mercados y plazas de la región. Los precios por fruto oscilan de 20 y 30 pesos en la época de producción (Zavala y Ballesteros, 2002).

La comercialización de los frutos se realiza desde los meses de julio, agosto, septiembre y en algunos lugares a principios de octubre. La exportación de los frutos frágiles exige un manejo cuidadoso y un empaquetado especial. La suma de normas cuarentenarias no han permitido hasta la fecha llevar dicha fruta a los mercados nacionales e internacionales. En cuanto a las preferencias del mercado la ilama con pulpa rosada es la de mayor demanda (Salvador, 1999).

### 2.1.2. Aspectos botánicos

La ilama es un árbol que posee frutos de pulpa rosada, púrpura y blanca. Es la especie que produce el fruto más fino y pulpa de excelente calidad, y que se encuentra con más frecuencia en el país, teniendo mayor valor comercial, por la preferencia en el mercado local, lo cual le genera ingresos al productor (Cruz-Pineda, 2002). El fruto mide cerca de 12 cm de largo, tiene pulpa blanca, rojiza o rosada con un aroma típico y un sabor dulce. Es una baya colectiva de forma elipsoidal u ovoide de cáscara gruesa y coriácea de color verde a rojo cenizo, el cual contiene numerosas semillas (Salvador, 1999). El peso promedio del fruto: 739g y tiene una forma ovoide a elipsoidal y con una gran variedad en la cáscara del fruto, observándose frutos sin protuberancia en el pericarpio (liso) y otros con protuberancias bien pronunciadas (rugoso). También se han encontrado frutos con protuberancias menos marcadas, esta cáscara puede ser de color verde pálido, morado claro y morado oscuro, cada fruto produce en promedio 70 semillas (Zavala y Ballesteros, 2002), Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Contenido nutricional del fruto de *Annona diversifolia* Saff.

Propiedad	%
Humedad	79.6
Proteínas	1.31
Grasa	0.01
Ceniza	1.26
Fibra cruda	0.97
Fósforo	0.030

Fuente: Cruz-Pineda (2002).

La mayoría de los árboles son de pie franco, es decir propagado por semilla, por lo que la raíz principal es de origen embrionario y pivotante, lo cual determina la fijación de estos árboles en las condiciones que se desarrollan como suelos marginales pese al alto porcentaje de pedregosidad. Son árboles relativamente pequeños y delicados, ramificados desde la base, de crecimiento erecto con un eje central dominante y ramas de escaso desarrollo que nacen de este eje. El árbol alcanza a medir hasta 8 m de alto. Las hojas son de forma oval, glabra, con pecíolo y hojas en forma redonda, de brácteas deciduas sin pecíolo, las que crecen en la base de pequeñas ramas. Los frutos presentan una apariencia polvosa, la cual se nota más en las variedades de pulpa blanca. Las flores poseen tres pétalos externos que son de 2 a 5 cm de longitud. El color de las flores es característico de la variedad y varía de rosado a rojo púrpura (Salvador, 1999).

### **2.1.3. Etapas fenológicas**

La ilama es una especie sub-caducifolia con un ciclo de crecimiento anual discontinuo que comprende una etapa de crecimiento activo (crecimiento vegetativo, floración y fructificación) y otra etapa de letargo. La primera coincide con la época de lluvias, con mayor humedad ambiental y con altas temperaturas; mientras que la segunda tiene lugar en forma coincidente, con la disminución de la humedad del suelo, así como con la temperatura. En la zona del norte de Guerrero el ciclo de crecimiento inicia en primavera (marzo-abril) con la nueva brotación; primero aparecen las flores e inmediatamente después se inicia la aparición de los nuevos brotes vegetativos, dado que las yemas son mixtas (Otero-Sánchez, 2005).

La apertura floral coincide con los meses más secos del año (abril-mayo) y perdura alrededor de dos meses. La formación del fruto ocurre durante la estación de lluvia y tiene una duración de 4-5 meses (mayo-septiembre); la cosecha tiene lugar a fines de verano a principios de otoño (septiembre-octubre). La formación y crecimiento de brotes, ramas y hojas inicia en primavera y culmina en verano; es posible que el crecimiento de raíces ocurra en un corto periodo, iniciando después del amarre del fruto y concluyendo antes de alcanzar el máximo tamaño del fruto, tal como ocurre en chirimoya. El letargo se establece gradualmente conforme disminuye la humedad del suelo y la temperatura ambiental; los árboles de ilama al igual que otras anonáceas

como la chirimoya y la atemoya, no se defolían completamente, quedando algunas hojas activas (Otero-Sánchez, 2005).

La germinación es de 15-22 días (luego de haber pasado su período de latencia que dura entre 6-12 meses). Una vez germinadas, las plantas que tienen de 3-4 hojas se transplantan a bolsas de polietileno negras de 9 x 12 pulgadas. Pasan en fase de vivero para el desarrollo de portainjertos, la cual puede variar de 6-12 meses, luego de ese tiempo se injerta y una vez que se haya logrado el éxito en esta labor puede pasar otros tres meses para poder establecerlos en el campo al comienzo de la estación lluviosa. Una vez establecidos los árboles entran en cosecha a los tres años estabilizándose ésta de los cinco años en adelante. La época de floración ocurre a partir del mes de abril y la cosecha ocurre desde julio y se extiende hasta finales de septiembre (Cruz-Pineda, 2002).

#### **2.1.4. Requerimientos climáticos y edafológicos**

El cultivo de la anona es considerado rústico ya que soporta condiciones adversas, propias de suelos que varían de franco arcilloso a arcillosos y pedregosos de hasta un 60% (tepetatosos) y con pH que va de 5.5-6.5. La planta requiere de un clima cálido, con temperaturas entre 24 a 37 °C y con una estación seca y húmeda. Se adapta bien desde una altitud de 100 a 800 m, en suelos franco arenoso y arcilloso, los cuales permiten un buen desarrollo vegetativo y productivo del cultivo (Cruz-Pineda, 2002). En esta especie se ha observado un alto grado de rusticidad a condiciones ambientales, lo cual se debe a mecanismos de resistencia a la sequía, que se expresa con la caída de las hojas durante la época seca (mes de noviembre) y en el mantenimiento de la turgencia foliar aun bajo condiciones de sequía moderada (Reyes, 1967). Por ello, es posible que tenga la capacidad de generar bajos potenciales hídricos en los tejidos radicales, lo que le permite sobrevivir en suelos secos de laderas empinadas (Zavala y Ballesteros, 2002).

#### **2.1.5. Problemática del cultivo de la ilama**

Este cultivo es una fuente de ingreso anual para los lugareños, lo cual indica que localmente tiene un gran potencial de comercialización, lo que despierta interés para mejorar este tipo de cultivo, propagarlo y producirlo a mayor escala. De igual manera este cultivo presenta una serie de limitantes, como la escasa información de manejo agronómico, lo cual reduce su potencial de aprovechamiento (Cañizares, 1966). Por consiguiente, la limitada expansión de su consumo

hacia otras zonas, puede deberse al hecho de que la producción es limitada, ya que no proviene de huertos, sino de poblaciones vegetales espontáneas, las cuales crecen en suelos pedregosos, poco profundos y ácidos, lo que ocasiona plantas propensas a enfermedades y al ataque de patógenos. El problema más grave es el de los frutos que se abren a la madurez, lo cual favorece la entrada de patógenos que afectan la calidad del fruto y dificultan su transporte (Zavala y Ballesteros, 2002).

## **2.2. Los microorganismos rizosféricos**

### **2.2.1. La micorriza arbuscular**

Se le conoce con el término micorriza, a la relación mutualista entre algunos hongos del suelo y las raíces de la mayoría de las especies vegetales, la palabra micorriza proviene del griego *mykes*= hongo y *rhiza*= raíz (Bücking y Shachar-Hill, 2005). La micorriza es la asociación simbiótica que se establece con la mayoría de las plantas superiores vasculares y hongos del orden de los Glomales (González-Chávez *et al.*, 2000; Brundrett, 2004). Las hifas sirven como extensión del sistema radical de la planta y a menudo aumentan la captación de nutriente y el crecimiento de la planta. Generalmente la captación de fósforo se aumenta con la simbiosis de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (Alexander, 1994). Existen siete tipos de micorriza; arbuscular, ectomicorriza, ectoendomicorriza, arbutoide, monotropoide, ericoide y orquidoide; de estas, la micorriza arbuscular es la más común, la cual tiene importancia agrícola y frutícola (Brundrett, 2002).

Así, la micorriza arbuscular estableció hace mucho tiempo simbiosis mutualista con la mayoría de las plantas de la Tierra, jugando un papel importante en la nutrición mineral, salud y así mismo esta simbiosis podría influir en la estructura de las comunidades de las plantas (Marsh y Schultze, 2001). Los HMA presentan unas hifas que conectan al hospedero del manto fúngico, como el micelio, el cual está embebido en el tejido de la raíz funcionando como extensión del sistema de radical de la planta y a menudo realizando funciones como; captación de nutrientes y aumento en el crecimiento de la planta (Becard *et al.*, 2004; Al-Karaki, 2002; Mamad *et al.*, 2003; Clark y Zeto, 2000).

La formación de la micorriza arbuscular es muy beneficiosa, ya que las hifas proporcionan a la planta acceso a nutrientes no móviles como el fósforo. Las plantas con raíces magnoloides necesariamente establecen relación con micorrizas ya que, ellas le proporcionan el fósforo que se encuentra lejano y la planta en recompensa le proporciona compuestos carbonados a las micorrizas y con esta relación ambos organismos son beneficiados. Otro de los beneficios que obtiene la planta de esta simbiosis es la capacidad adaptativa e incremento en el crecimiento radical, y a la vez contribuye a la sanidad y longevidad de las raíces (Smith *et al.*, 2000; Norman *et al.*, 1996; Jeffries y Barea, 1994).

La micorriza arbuscular también captura el nitrógeno de parches orgánicos y lo transporta hacia la planta (Hodge y Fitter, 2000; Read y Pérez, 2003). La micorriza le proporciona a la planta la capacidad de tolerar la sequía, altas temperatura del suelo, toxicidad por metales pesados, pH extremos y evita el estrés al transplantarse, así mismo induce a la planta a la producción de fitohormonas que son indispensables para el crecimiento de estas (Varma *et al.*, 2001). En el Cuadro 2 se mencionan algunos frutales que establecen simbiosis con los HMA.

**Cuadro 2.** Frutales que establecen simbiosis con hongos micorrízico arbusculares (HMA).

Planta	Hongos micorriza arbuscular	Fuente
<i>Carica papaya</i> cv. (Maradol roja)	<i>Glomus</i> sp. Zac-2; <i>Glomus aggregatum</i> FS-39.	Alarcón <i>et al</i> (2000)
<i>Persea americana</i> (Aguacate)	Zac-19	Reyes (2000)
<i>Annona cherimola</i> Mill (Cherimoya)	<i>Glomus aggregatum</i> y <i>Glomus mosseae</i>	Franco-Ramírez <i>et al</i> (2004)
<i>Annona muricata</i>	<i>Glomus</i> Zac-1; Zac-19	Jaen y Ferrera-Cerrato (1989)
<i>Carica papaya</i> (Papaya)	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i> , <i>Glomus manihotis</i>	Rodríguez-Romero <i>et al</i> (2004)
<i>Citrus volkameriana</i> (limón)	<i>Glomus mosseae</i> , Zac-19	Sánchez y Ferrera-Cerrato (2004)
Musa AAA cv. enano gigante (Plátano)	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus clarum</i> , <i>Glomus monosporum</i> y <i>Glomus etunicatum</i>	Michel <i>et al</i> (1996)
<i>Citrus reticulata</i> , (Mandarina)	Zac-19 y <i>Glomus intraradices</i>	Vázquez <i>et al</i> (1996)

Con las especies de plantas antes mencionadas se fundamenta el uso de HMA en el manejo de plantas en vivero, ya que en esta fase se propician algunas prácticas que pueden ser modificadas, de tal forma que en conjunción con fertilizaciones moderadas se contribuya a que los microorganismos benéficos aplicados puedan ser funcionales y efectivos, y al mismo tiempo, las plantas obtengan mayor vigor para acortar su estancia en vivero (Ryan y Graham, 2002). Sin embargo, no hay que olvidar que el uso de estos microorganismos benéficos debe preferentemente ser de origen mexicano, ya que con ello se puede reducir el impacto en la biodiversidad microbiana en comparación con microorganismos extranjeros (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999; Davies *et al.*, 2000). En diversas investigaciones se ha puesto de manifiesto la importancia de aplicar HMA en frutales durante su manejo en vivero.

Mediante estos estudios se ha podido definir el beneficio de estos hongos en las plantas, particularmente como elementos con capacidad promotora del crecimiento, reguladores de fisiológicos de las plantas en diversas condiciones y como agentes de control de organismos patogénicos de hábito radical. El manejo y aplicación de los HMA ha cobrado especial interés en México, ya que es posible encontrar diversos productos denominados biofertilizantes a base de estos hongos benéficos (González-Chávez *et al.*, 1998).

### **2.2.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

En las plantas las bacterias promotoras del crecimiento (BPCP) son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y productividad vegetal. Las especies más conocidas se encuentran en los géneros pertenecientes a *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y *Azospirillum*. Las BPCP pueden clasificarse en dos grupos: bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde las bacterias afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas (Bashan y Holguin, 1998).

El otro grupo son bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad para el control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos. Se ha observado que el incremento causado por los microorganismos, se debe principalmente a que producen reguladores de crecimiento como auxinas, giberelinas y citocininas, además de que también fijan nitrógeno (Díaz-Vargas, 1998). Las bacterias que producen fitohormonas son otro grupo de las promotoras de crecimiento que pertenecen a los géneros de *Azospirillum* y *Azotobacter* penetran la corteza de la raíz y pueden producir fitohormonas, como son: las giberelinas, auxinas, citocininas y ácido absísico.

El siguiente grupo de rizobacterias promotoras de crecimiento son las que producen antibiosis, que es el antagonismo entre organismos, mediante metabolitos específicos o no específicos de origen microbiano. La mayoría de estos antibióticos son producidos por los microorganismos del suelo (Arteaga-León, 1997). Una gran variedad de actinomicetos, bacterias y hongos son capaces de sintetizar antibióticos. De las bacterias que sintetizan antibióticos se encuentran con más frecuencia especies de *Bacillus* y cepas de *Pseudomonas* que liberan piocianina y compuestos relacionados. Los antibióticos son efectivos al inhibir o matar hongos, bacterias y actinomicetos susceptibles (Alexander, 1994).

### **2.2.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno**

El nitrógeno es muy abundante en la atmósfera, sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos o amonio. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual, microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado (D'Haeze *et al.*, 2002). Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80% de la fijación biológica de nitrógeno (Hynes y Finan, 1998; Downie, 1998). Las bacterias fijadoras de nitrógeno influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluso en algunas ocasiones incrementan el rendimiento. La fijación biológica del nitrógeno es realizada por microorganismos que poseen la enzima nitrogenasa la cual, esta involucrada en la catalización de la reacción de  $N_2$  a  $NH_3$ . La mayor contribución de los microorganismos a los ecosistemas y agroecosistemas en cuanto al nitrógeno, se debe a la fijación biológica de este nutrimento esencial para las plantas. Los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre que utilizan

el nitrógeno atmosférico, son los que se encuentran en la rizosfera y los simbióticos son los que se encuentran en íntima asociación con la raíz, formando nódulos. El grupo de bacterias de vida libre pertenece a las bacterias aerobias y anaerobias y bacterias fotoautótrofas y algunos géneros de cianobacterias, en las simbióticas se encuentra *Rhizobium* (anaerobio) (Rodríguez, 1995). Así pues, esta eficiencia se ha comprobado con la inoculación de *Azotobacter* sp. Algunas cepas de *Azospirillum* en forma líquida, y recubriendo la semilla de trigo, aumentan hasta 22% en rendimiento, siendo el inóculo líquido la mejor opción para la bicepa (*Azotobacter* y *Azospirillum*), ya que estas bacterias son las que le fijarán nitrógeno a la planta para un buen desarrollo (Berg *et al.*, 1980). La contribución de la fijación de nitrógeno bacteriano al balance de nitrógeno de las plantas, está fundamentada en el hecho de que la actividad de la nitrogenasa en raíces se incrementa significativamente (Patnaik *et al.*, 1994).

#### **2.2.4. Rizobacterias solubilizadoras de fosfato**

Otro grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento son las solubilizadoras de fosfatos en donde la fuente original de fósforo en el suelo es la apatita  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ , los iones solubilizados  $\text{H}_2\text{PO}_4$ . En el suelo existen fosfatos orgánicos e inorgánicos. Los compuestos que contienen fósforo orgánico provienen de las plantas y los microorganismos, estos son compuestos como ácidos nucleicos, fosfolípidos y fitina. La deficiencia de fósforo puede presentarse en plantas cultivadas en suelos deficientes en fósforo (Subba-Rao, 1985).

Los compuestos inorgánicos insolubles de fósforo no están siempre disponibles para las plantas, aunque muchos microorganismos pueden solubilizar al fosfato. Esta propiedad no es rara, ya que un décimo a un medio de los aislamientos bacterianos probados, en general, son capaces de solubilizar fosfatos de calcio, y los conteos bacterianos solubilizadores de fosfatos insoluble pueden variar de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ . Dichas bacterias, a menudo, son abundantes en la superficie de las raíces. Los géneros de bacterias y hongos activos en la conversión son: *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Aspergillus* entre otras. Estas bacterias y hongos crecen en medios con  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , apatita o materiales insolubles semejantes (Al-Nahidh y Gomah, 1991).

### 2.3. Conclusiones de revisión de literatura

La fruticultura tropical mexicana posee gran diversidad frutícola, por lo cual puede abastecer la demanda mundial de los países desarrollados.

Entre los cultivos más promisorios se encuentran las anonáceas, con gran variedad de especies como la chirimoya y la guanábana, las cuales han sido más estudiadas y comercializadas.

La ilama es una planta de gran importancia en la zona noroeste del estado de Guerrero, específicamente en la región de Tierra Caliente, en donde su comercialización local es buena y el costo por fruto oscila entre 20 a 30 pesos, lo cual indica gran valoración del fruto por la población de esta zona.

La ilama es muy apreciada en la Región de Tierra Caliente de Guerrero, por su excelente sabor y por ser un cultivo con potencial comercial.

El cultivo de ilama presenta varias limitantes como la falta de información acerca de su cultivo, manejo, enfermedades, plagas, postcosecha (el fruto se abre en la madurez), escasa información acerca de los microorganismos simbióticos de este y escasa investigación para potenciar su comercialización.

### 2.4. Literatura citada

- Alarcón, A., y Ferrera-Cerrato, R. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra* 17: 179-191.
- Alarcón, A., Davies, Jr. J. N., Egilla, T. H., Fox, A. A., Estrada-Luna y Ferrera-Cerrato, R. 2000. Interacción *Azospirillum brasilense* y *Glomus clavoides* en *Carica papaya* cv. Maradol bajo deficiencia de fósforo. *In: Memoria Reunión Iberoamericana y III Symposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica*. Guanajuato. México.
- Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor, México, D.F. México.
- Al-Karaki, G. N. 2002. Field response of garlic inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi to phosphorous fertilization. *Journal of Plant Nutrition* 25: 747-756.

- Al-Nahidh, S. y Gomah, A. H. M. 1991. Response of wheat to dual inoculation with VA-mycorrhiza y *Azospirillum*, fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent. *Arid Soil Res. Rehabil.* 5: 83-96.
- Arteaga-León, C. 1997. Bacterias fijadoras de nitrógeno de la rizosfera, caulosfera y filósfera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillos, estado de México 135 p.
- Bashan, Y. y Holguin, G. 1998. A proposal for the division of "plant growth-promoting rhizobacteria" into two classifications: biocontrol-plant growth-promoting bacteria and plant growth-promoting bacteria. *Soil Biol. Biochemistry* 30: 1225-1228.
- Bécard, G. S., Kosuta, M., Tamasluokht, N., Sejalon-Delmans y Rous, C. 2004. Parther communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany* 82: 1186-1197.
- Bücking, H. y Yair, Shachar-Hill. 2005. Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist* 165: 899-912.
- Brundrett, M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304.
- Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 79: 473-495.
- Calderón, A. E. 1989. Fruticultura general. El esfuerzo del hombre. ed. Limusa. México.
- Cantwell, T. M. 1979. The fruits of the genus *Annona*. *Inter. Agric.* No. 298: 26 p.
- Cañizarez, Z. J. 1966. Las frutas anonáceas. Ediciones Fruiticuba 66. La Habana, Cuba. 63 p.
- Clark, R. B. y Zeto, S. K. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* 23: 867-902.
- Cruz-Pineda, E. 2002. Cultivo de *Annona*. Boletín Técnico No. 7 CENTA. 20 p
- Davies, Jr. F. T., Estrada-Luna, A. A., Finnerty, T. L., Egilla, J. N. y Olalde-Portugal, V. 2000. Applications of mycorrhizal fungi in plant propagation systems. pp: 129-146. *In*: A. Alarcón, y R. Ferrera-Cerrato (eds.). *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Mundi Prensa, México.
- D'Haeze, W., Verplancke, C., Mironov, V. y Holsters, M. 2002. pMH11, a tool for gene disruption and expression analysis in *Azorhizobium caulinodans* Plasmid 47: 88-93.

- Downie, J. A. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes, pp. 387-402. *In*: H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas (eds), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Díaz-Vargas, P. 1998. Biofertilización del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) con bacterias promotoras del crecimiento y micorriza arbuscular y vermicomposta. Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillos estado de México. 119 p.
- Evangelista-Lozano, S., Crua-Castillo, J. G., Pérez-González, S., Mercado-Silva, E., Davila-Ortiz, G. 2003. Producción y calidad frutícola de guanabanos (*Annona muricata* L.) provenientes de semilla de Jiutepec, Morelos, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9: 69-79.
- Franco-Ramírez, A., Manjares-Martínez, M. J., Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. 2004. Crecimiento de *Annona cherimola* Mill. Inoculada con hongos micorrízicos arbusculares aislados de la rizosfera de anonáceas. 105 p. *In*: (2004) González-Chávez, M. C., J. Pérez-Moreno, R. Ferrera-Cerrato, M. P. Ortega-Larrocea. Y. Carreño-Abud y Valencia-Cantero, E. (compiladores), *Resúmenes de IV Symposium Nacional y II Symposium Iberoamericano de la Simbiosis Micorrízica*. Morelia, Michoacán México.
- Founque, A. 1972. Espèces fruitières d'amerique tropicale fruti. D' outtre-mer. 27: 62-72.
- González-Chávez, M. C., Ferrera-Cerrato, R. y Pérez-Moreno, J. 1998. Biotecnología de la micorriza arbuscular en fruticultura. Universidad Autónoma de Tlaxcala y Colegio de Postgraduados. 135 p.
- González-Chávez, M. C., Ferrera-Cerrato, R., Villegas-Monter y Oropeza, J. L. 2000. Selección de sustratos de crecimiento en microplántulas de cítricos inoculadas con *Glomus sp.* *Zac-19. Terra* 18.
- González, A. L. 2003. Diagnostico nutrimental y patológico del cultivo de Guanábana (*Annona muricata* L.) en el estado de Tabasco. Tesis de maestría en ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillos, estado de México, 110 p.
- Hynes, M. F. y Finan, T. M. 1998. General genetic knowledge. *In*: "The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria" (H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds.), pp. 25-43. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.

- Hodge, A., Robinson, D. y Fitter, A. H. 2000. An arbuscular mycorrhizal inoculum enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from, nutrient-rich patches in soil. *New Phytologist* 145: 575-584.
- Jaen, C. D., Ferrera-Cerrato, R. 1989. Respuesta micotrófica de Guanábana (*Anona muricata*) y chirimoya (*Anona cherimola*) a la inoculación con hongos endomicorrízicos en vivero. 154 p. *In: Memorias XXII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*. Montecillos, México.
- Jeffries, P., y Barea, J. M. 1994. Biochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil system. *In: S. Gianinazzi, and H. Schuber (eds.) Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhauser Verlag Basel. Switzerland. pp. 101-115.
- Marsh, J. F. y Schultze, M. 2001. Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytologist* 150: 525-532.
- Michel, A., Farias, J., Valdovinos, G. y Guzmán, S. 1996. Selección de hongos micorrízicos arbusculares para la producción en vivero de vitroplantas de plátano (*Musa AAA*) cv. Enano gigante. 48 p. *In: (1996) Trejo-Aguilar, D., Escalona-Aguilar, M.A., Rivera-Fernández, A., Ferrera-Cerrato, R., Pérez-Moreno, J., González-Chávez, C. (compiladores), resúmenes del I Symposium Nacional de la Simbiosis micorrízica*. Xalapa, Ver. México.
- Mamad, M. J., Malkawi, H. I. y Shibli, R. 2003. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorous fertilization on growth and nutrient uptake of barley grown on soil with different levels of salts. *Journal of Plant Nutrition* 26: 125-137.
- Norman, J. R., Atkinson, D. y Hooker, J. E. 1996. Arbuscular mycorrhizal fungal-induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*. *Plant and Soil* 185: 191-198.
- Ochse, J. J., Soule Jr. M. J., Dijkman, M. J. y Wehlborg, C. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. vol. 2. Trad. del inglés por Blackler Valdez Alonso. Ed. Continental S.A. México. 771 p.
- Otero-Sánchez, M. A. 2005. Fenología, fisiología y producción de ilama (*Annona diversifolia* Saff.). Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, Texcoco, edo. de México. 196 p.
- Palacios, R. M. I. y Cano, G. G. V. 1997. La comercialización de anonáceas en México. Una aproximación a su estudio. Chapingo. México. pp. 68-91.

- Patnaik, G. K., Bose, L. K., Mehta, A. M. y Rao, V. R. 1994. Rhizosphere nitrogenase and *Azospirillum* sp. association with wild, trisomic and cultivated rice. *Microbiol. Res.* 149: 42-46.
- Reyes, A. J. C. 2000. Micorriza arbuscular, bacteria y vermicomposta en el desarrollo de aguacate raza mexicana (*Persea americana* Mill.) en un sustrato alternativo de vivero. Tesis de Maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, estado de México. 99 p.
- Reyes, J. 1967. Algunas recomendaciones para el control del perforador de las semillas de anonáceas. *Agricultura Tropical (Colombia)* 23: 530-531.
- Rodríguez, M. N. 1995. Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. 233 p. *In*: Ferrera-Cerrato, R. y J. Pérez-Moreno. (eds.). *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados en ciencias Agrícolas, Montecillo, Estado de México.
- Rodríguez-Romero, A. S., Genmerli-Pérez, J., Barroso-Núñez, L. y Jaizme-Vega, M. C. 2004. Aplicaciones de los hongos formadores de micorrizas arbusculares sobre el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) en islas canarias. 105 p. *In*: (2004) González-Chávez, M. C., Pérez-Moreno J., R. Ferrera-Cerrato, M. P. Ortega-Larrocea. Y. Carreño-Abud y Valencia-Cantero, E. (compiladores), *Resúmenes de IV Symposium Nacional y II Symposium Iberoamericano de la Simbiosis Micorrízica*. Morelia, Michoacán México.
- Ruíz, S. E. y Alatorre, M. L. 1999. Las Anonas en el México prehispánico *Revista DINTEL* 7: 49-62.
- Read, D. J. y Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems journey towards relevance?. *New Phytologist* 157: 475-492.
- Ryan, M. H. y Graham, J. H. 2002. Is there role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture?. *Plant and Soil* 244: 263-271.
- Sánchez, C. M. J. y Ferrera-Cerrato, R. 2004. Efecto de las micorrizas arbusculares y la vermicomposta en *Citrus volkameriana*. 105 p. *In*: (2004) González-Chávez, M. C., J. Pérez-Moreno, R. Ferrera-Cerrato, M. P. Ortega-Larrocea. Y. Carreño-Abud y Valencia-Cantero, E. (compiladores), *Resúmenes de IV Symposium Nacional y II Symposium Iberoamericano de la Simbiosis Micorrízica*. Morelia, Michoacán México.
- Salvador. 1999. El cultivo de *Annona*. Guía Salvadoreña. 8 p

- Smith, F. A., Jakobsen, I. y Smith, S. E. 2000. Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 147: 357-366.
- Subba Rao, N. S., Tilak, K. V. B. R. y Singh, C. S. 1985. Effect of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant Soil* 84: 283-286.
- Varma, A., Singh, A., Sudha, Sahay, N. S., Sharma, J., Roy, A., Kumari, M., Rana, D., Thakran, S., Deka, D., Bharti, K., Hurek, T. Blechert, O., Rexer, K. H., Kost, G., Hahn, A., Maier, W., Walter, M., Strack, D., Kranner, I. 2001. *Piriformospora indica*: an axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. *The mycota IX. Fungal associations*. ed. Hock. pp. 125-150.
- Vázquez F., P.V., M.C. González-Chávez, R. Ferrera-Cerrato y A. Villegas-Monter. 1996. Enraizamiento de estacas de citrangecarrizo y mandarina cleopatra con diferentes dosis de ácido indol 3-butírico y dos cepas endomicorrízicas arbusculares. 20 p. *In: Programas y Resúmenes. 1er. Symposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz.*
- Vidal. 1983. El cultivo de la guanábana en México. SARH. CONAFRUIT. México. 51 p.
- Zavala, H. F. y Ballesteros, P. G. 2002. Perspectivas de las Anonáceas en México: caso de la Ilima (*Annona diversifolia* Saff.). Primer congreso Nacional de Anonáceas. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, edo. de México. 143 p.

## Capítulo 3

### OBJETIVOS E HIPOTESIS

#### 3.1. Objetivo general

1. Evaluar el efecto de la estacionalidad, la fenología y la defoliación en las poblaciones de los microorganismos rizosféricos y filosféricos de árboles tropicales de ilama (*Annona diversifolia* Saff.), en San Antonio de las Huertas, Tlapehuala, Guerrero.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar las poblaciones rizosféricas de hongos, actinomicetos, bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos asociadas a *Annona diversifolia* en estadios fenológicos en cuatro estaciones del año.
2. Evaluar la dinámica de las estructuras de hongos micorrízicos arbusculares y hongos endófitos en las raíces de *Annona diversifolia* en tres estadios fenológicos en cuatro estaciones del año.
3. Evaluar las poblaciones de hongos, bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos asociadas con las hojas y las brácteas de *Annona diversifolia* en tres estadios fenológicos en tres estaciones del año.
4. Evaluar en un ensayo en invernadero, el efecto de la defoliación de plantas de *Annona diversifolia* inoculadas con tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares, en el crecimiento vegetal, contenido nutrimental y dinámica de estructuras micorrízicas.

### **3.3. Hipótesis general**

Las poblaciones de microorganismos rizosféricos y filósfericos de plantas de ilama (*Annona diversifolia* Saff.), son afectadas diferencialmente por la estacionalidad, la fenología y la defoliación, en San Antonio de las Huertas, Guerrero.

### **3.4. Hipótesis específicas**

1. En términos generales, las poblaciones de microorganismos asociados a plantas de ilama son más abundantes en la época de lluvia, en comparación con las encontradas en épocas de sequía.
2. La intensidad de colonización por arbusculos y vesículas en las raíces de ilama aumenta en época de lluvia comparada en la encontrada en la época de sequía.
3. Las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en hojas de ilama son menores en las épocas con mayor precipitación en comparación con las épocas de sequía.
4. En el caso de las brácteas, las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas de ilama juveniles son mayores comparadas con las de las plantas adultas.
5. Las plantas de ilama defoliadas en condiciones de campo e invernadero reducen su colonización micorrízica total, y sus poblaciones de bacterias rizosféricas, en comparación con las de plantas no defoliadas.

## Capítulo 4

### DINÁMICA DE LA MICORRIZA ARBUSCULAR Y MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE *Annona diversifolia* Saff., COMO RESPUESTA A LA ESTACIONALIDAD Y DEFOLIACIÓN EN EL TRÓPICO SECO

Jazmín Cortés Sarabia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

#### Resumen

La ilama es una planta tropical de importancia local en el estado de Guerrero. La cual, se encuentra distribuida en México, Centroamérica y parte de Sudamérica. Esta planta se defolia completamente en épocas de sequía. Asimismo, su fenología es marcada por diferentes estaciones del año, por tales características muy particulares en el presente estudio se realizaron muestreos en ecosistema natural de plantas de ilama (*Annona diversifolia* Saff.), durante un año para determinar el efecto que tiene la defoliación y la estacionalidad en la dinámica poblacional de algunos microorganismos. Adicionalmente, en una prueba de invernadero utilizando diferentes cepas micorrízicas, se evaluó el efecto de la defoliación sobre la colonización micorrízica, número de esporas y las poblaciones de algunos grupos microbianos. En campo se seleccionaron tres etapas de crecimiento de esta especie y cuatro estadios fenológicos. También se muestrearon durante cuatro estaciones las raíces y suelo rizosférico. Se encontró, correlación positiva entre plantas no defoliadas de ilama en campo y en invernadero, con respecto a la colonización micorrízica. Para el número de esporas se observó la misma tendencia, encontrándose mayor número de esporas en plantas de campo al inicio de la defoliación y en plantas de invernadero en plantas defoliadas. Se observó que la colonización micorrízica total, esta correlacionada positivamente con las épocas de bajas temperatura y mayor precipitación (agosto y octubre). La densidad de esporas fue mayor en épocas cuando la precipitación era baja. Los resultados sugieren, que esta especie es dependiente de la micorriza activa, ya que durante los estadios de llenado del fruto existió mayor demanda nutrimental por parte de la planta y fue cuando se encontró mayor colonización micorrízica. En las épocas con mayor precipitación tanto en campo y en vivero la mayor colonización micorrízica se observó en plantas no defoliadas. Los resultados indican que la esporulación para campo e invernadero es mayor en épocas secas y en plantas defoliadas. En conclusión, la dinámica poblacional microbiana se ve influenciada por factores como: temperatura, precipitación, fenología de la planta y defoliación.

**Palabras claves:** estacionalidad, defoliación, colonización micorrízica arbuscular, bacterias y hongos.

DYNAMICS OF THE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL AND RIZOSPHERIC  
MICROORGANISMS OF *Annona diversifolia* Saff. IN RESPONSE TO SEASONALITY AND  
DEFOLIATION IN A DRY TROPICAL AREA

Jazmín Cortés Sarabia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

**Abstract**

The ilama is a tropical plant of local importance in the state of Guerrero. The which is distributed in Mexico, Central America and parts of South America. This plant is completely defoliated in the season. Therefore, its also phenology is marked by different seasons. Such very specific characteristics in the present study samples were taken in natural ecosystem of plants ilama (*Annona diversifolia* Saff.), for a year to determine the effect of defoliation and seasonality in the population dynamics of certain microorganisms. Additionally, in a trial under greenhouse the effect of the defoliation on the mycorrhizal colonization, the number of spores and the populations of some microbial groups was studied. In field three stages of growth of this species and four phenological stages. were selected. During four seasons roots and rhizospheric soil were sampled. No positive correlation between defoliated plants in field and greenhouse. Were found in relation to the mycorrhizal colonization. For the number of spores we noted the same trend, with a greater number of spores at the start of the defoliation. It was noted that the total mycorrhizal colonization, positively correlated with the season of low rainfall and higher temperatures (August-October). The density of spores was higher in times when rainfall was low. The results suggest that this species is dependent on mycorrhiza, and that over the fruit filling stadiums there is a higher nutrient demand on the shoot when it more mycorrhizal colonization was found. In times more precipitation both in field and nursery the largest mycorrhizal colonization was observed in non-defoliated. The results indicate that the sporulation in greenhouse and field is higher in dry periods in defoliated plants. In conclusion, the microbial population dynamics was influenced by factors such as temperature, precipitation, phenology of the plant and defoliation.

**Key words:** seasonality, defoliation, arbuscular mycorrhizal colonization, bacteria and fungi.

#### 4.1. Introducción

La ilama es una especie tropical nativa, la cual crece de forma silvestre en las colinas de la costa suroeste de México y Centroamérica (Pinto *et al.*, 2005). Su nombre científico *Annona diversifolia* le es dado, por que posee dos tipos de hojas una obovada peciolada y brácteas redondeadas no pecioladas que crecen en la base de las ramas pequeñas (FAO, 1994). Este árbol tropical deciduo que alcanza alturas de 7 a 8 metros, produce frutos que han sido apreciados de manera ancestral en México y fueron denominados el “custard” de los aztecas (Ochse *et al.*, 1965; Morton, 1987). El primer registro conocido de esta planta fue hecho por Francisco Hernández que fue enviado por el rey Felipe II de España en 1570 para tomar nota de los productos útiles de México (Morton, 1987).

Los frutos poseen un gran potencial económico para los pobladores de regiones marginales en tierras bajas y cálidas del sureste de México, debido a su apreciado sabor, aroma y a los colores púrpura, rosa y blanco de su pulpa (Salvador, 1999). Adicionalmente, se ha registrado que esta planta posee efectos anti-inflamatorios, analgésicos, antiepilépticos, anticonvulsivos y ansiolíticos (González-Trujano *et al.*, 2001; López-Rubalcava *et al.*, 2006). Las plantas de ilama se defolían totalmente en la época de sequía, durante los meses de enero a abril, independientemente de la edad. Dado que el follaje origina un abastecimiento de carbono hacia la raíz, la defoliación trae como consecuencia cambios en la microbiota rizosférica asociada con las plantas. El efecto de la defoliación sobre los HMA ha sido estudiado principalmente en pastos (Gehring y Whitham, 1994; Allsop, 1998). Hasta donde conocemos no existe información del efecto de la defoliación sobre los HMA y otros microorganismos en frutales tropicales arbóreos. Ramos-Zapata *et al.* (2006) evaluaron el efecto de la estacionalidad en el porcentaje de la colonización micorrízica en palma *Desmoncus orthacanthus* Martius, en un bosque tropical maduro semiperenne. Dichos autores, encontraron que los mayores porcentajes de colonización micorrízica, en condiciones naturales para cuatro estadios definidos de crecimiento de esta palma, se presentaron en las épocas de mayor precipitación. Camargo-Ricalde y Esperon-Rodríguez (2005) estudiaron el efecto de la heterogeneidad espacial y estacional del suelo sobre la distribución y abundancia de esporas de hongos micorrízico arbusculares en *Mimosa* spp. En el valle de Tehuacan Cuicatlán, encontraron que el número total de esporas en el suelo tiende a ser mayor durante la estación de lluvias y menor durante la estación de sequía.

Nascimento de Oliveira y Antonio de Oliveira (2005) estudiaron a dos especies de árboles frutales tropicales *Theobroma grandiflorum* y *Pullinia cupana*, encontraron que en *T. grandiflorum* la colonización HMA y el número de esporas estaba estrechamente correlacionada con la precipitación pluvial, la textura y con la concentración de Mg y K. Asimismo, Mark *et al.* (2007) midieron la dinámica microbiana en suelos irrigados con pastos durante siete años, encontraron que las poblaciones de hongos y bacterias incrementaban en la época con mayor humedad. Estos autores concluyeron que la estacionalidad y los factores medio ambientales influyen en las comunidades microbianas.

Existen diversos microorganismos de gran importancia funcional asociados con las raíces de las plantas tropicales dentro de los que se incluyen los hongos micorrízicos y diversos grupos de bacterias solubilizadoras de fosfatos y fijadoras de nitrógeno, los cuales han sido estudiados con cierta profundidad (cf. Pérez-Moreno y Ferrera-Cerrato, 1997; Alarcón *et al.*, 2007). Adicionalmente, el efecto de la estacionalidad en los hongos micorrízicos y bacterias rizosféricas en árboles tropicales ha recibido escasa atención. Es por ello que en el presente trabajo se estudió el efecto de la estacionalidad y defoliación sobre la dinámica de los microorganismos rizosféricos de ilama (*Annona diversifolia* Saff.).

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Recolecta de material biológico en campo**

El estudio se realizó en la localidad de San Antonio de las Huertas, Tlapehuala, estado de Guerrero. La localidad se encuentra ubicada en la región de Tierra Caliente, en el noreste del estado, a 18°16' 39'' latitud norte y 100°31'03' longitud oeste, a una altitud de 250 a 360 m. El clima es cálido subhúmedo con temperaturas mínimas y máximas de 25 y 30 °C y 36 y 40 °C en los meses de diciembre y mayo, respectivamente (INEGI, 2006). Las características físicas y químicas del suelo se observan en el cuadro 4.1. Se estudiaron las poblaciones de microorganismos rizosféricos en tres estadios de crecimiento de las plantas de ilama en cuatro épocas del año. Los estadios de crecimiento estudiados fueron, plantas de: i) 1 a 8 meses; ii) 1 a 3 años y iii) 4 a 20 años. Se muestrearon 10 plantas de cada edad, distribuidas en áreas naturales de alrededor de 140 m<sup>2</sup> de extensión. Cada uno de estos estadios de crecimiento fueron muestreados en el 2005 y 2006 los cuales correspondieron a los siguientes estadios fenológicos

en plantas maduras: I: llenado de fruto (agosto); II: presencia de frutos maduros (octubre); III: inicio de defoliación (enero) y IV: defoliación completa y formación de yemas nuevas (marzo). Con la finalidad de asegurar que las colectas se efectuaran en los mismos individuos, estos fueron marcados con pintura y cintas de plástico, excepto los individuos de 1 a 8 meses de edad en los cuales los muestreos fueron destructivos. El muestreo que consistió en coleccionar alrededor de 15 g de raíz y 1 kg de suelo, para cada edad, en cada época del año, se efectuó en los 10 cm superficiales de las distintas áreas de muestreo, debido a que los muestreos preliminares demostraron que en esta zona existía la mayor cantidad de raíces finas.

#### **4.2.1.1. Evaluación de hongos micorrízicos**

Se evaluó la colonización micorrízica de las raíces y el número de esporas en suelo rizosférico, en muestras compuestas, para cada edad, en cada época del año. Para la evaluación de la colonización micorrízica, se empleó la técnica de clareo y tinción de Phillips y Hayman (1970). Se determinó el porcentaje de colonización de arbusculos, vesículas, hifas y colonización total para cada planta. Adicionalmente, se evaluó la colonización total por hongos endófitos distintos de los micorrízicos. Para cada muestra de raíz se evaluaron 75 campos visuales en 25 segmentos de raíces montadas en lactoglicerol. Asimismo, se evaluó la densidad de esporas de hongos micorrízico arbusculares en 100 g de suelo rizosférico de cada planta, siguiendo la técnica de extracción de Gerdemann y Nicolson (1963).

#### **4.2.1.2. Evaluación de microorganismos rizosféricos**

Se evaluaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos, actinomicetos, bacterias totales, mediante conteo en placa, siguiendo los métodos rutinarios de microbiología de suelos (Ferrera-Cerrato y González-Chávez, 1993). Para ello se utilizaron los medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA), Czapeck, agar nutritivo (AN) y Picovskaya (Pikovskaya, 1948). Con el mismo método se evaluaron poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en los medios de cultivo NFb, LG para *Azotobacter*, LG para *Beijerenckia* y LG para *Derxia* (Lipman, 1903). Cabe mencionar que estos medios no son 100% selectivos, por lo cual las poblaciones evaluadas macromorfológicamente afines a estos géneros bacterianos. Para la evaluación de las bacterias solubilizadoras de fosfatos crecidas en medio Pikovskaya, solamente se contabilizaron aquellas colonias que presentaban un halo. Las evaluaciones se efectuaron entre 3 y 8 días después de la

siembra. Se efectuó una caracterización macro y micromorfológica para los géneros mencionados anteriormente. Para cada edad, en cada época del año, se sembraron tres diluciones con cinco repeticiones para cada uno de los medios de cultivo estudiados. Las placas se incubaron a 28 °C.

#### **4.2.1.3. Análisis estadístico**

Se muestrearon 10 plantas completamente al azar. Los datos que se obtuvieron en las diferentes variables evaluadas, se les realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). En el caso de los valores de colonización micorrízica, que se expresaron como porcentajes, los datos se transformaron, y sus arcosenos se utilizaron en los análisis de varianza. Los valores de UFC se transformaron a logaritmos previos a los análisis de varianza respectivos. Los datos se analizaron con el paquete estadístico SAS 6.03 (SAS Institute, 1999).

#### **4.2.2. Experimento en vivero**

Las plántulas de ilama se obtuvieron de semillas colectadas en poblaciones naturales en San Antonio de las Huertas en noviembre del 2005. Los inóculos de hongos micorrízicos arbusculares que se utilizaron fueron los siguientes: i) consorcio Zack-19, que contenía las especies *Glomus albidum*, *Glomus claroides* y *Glomus diaphanum* (Chamizo *et al.*, 1998), ii) *Glomus intraradices* y iii) *Acaulospora delicata*. Estas cepas fueron proporcionadas por el área de microbiología de suelos, del Colegio de Postgraduados. Las cepas fueron propagadas en plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) o de leucaena (*Leucaena leucocephala* L.). El inóculo por planta consistió en: i) segmentos de raíces colonizadas con más de 90% y ii) alrededor de 20 g de arena con más de 200 esporas por 10 g de suelo-inóculo.

##### **4.2.2.1. Siembra de plantas y transplante**

Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% en agua destilada y se efectuaron enjuagues con agua estéril. Posteriormente, las semillas se sembraron en charolas con 3 kg de arena estéril. Las plántulas fueron transplantadas cuando tenían alrededor de 6 cm de altura a bolsas de polietileno negro que contenían 4 kg de sustrato estéril. Dicho sustrato consistió en una mezcla de vermicomposta, suelo y arena en proporción 1:4:5, cuyas características físicas y químicas se muestran en el Cuadro 1. La inoculación micorrízica, cuando así correspondía a los

tratamientos, consistió en aplicar 30 g de inoculante y colocarlo en contacto con las raíces de las plantas. Las plantas fueron inicialmente regadas con agua destilada.

#### **4.2.2.2. Variables evaluadas**

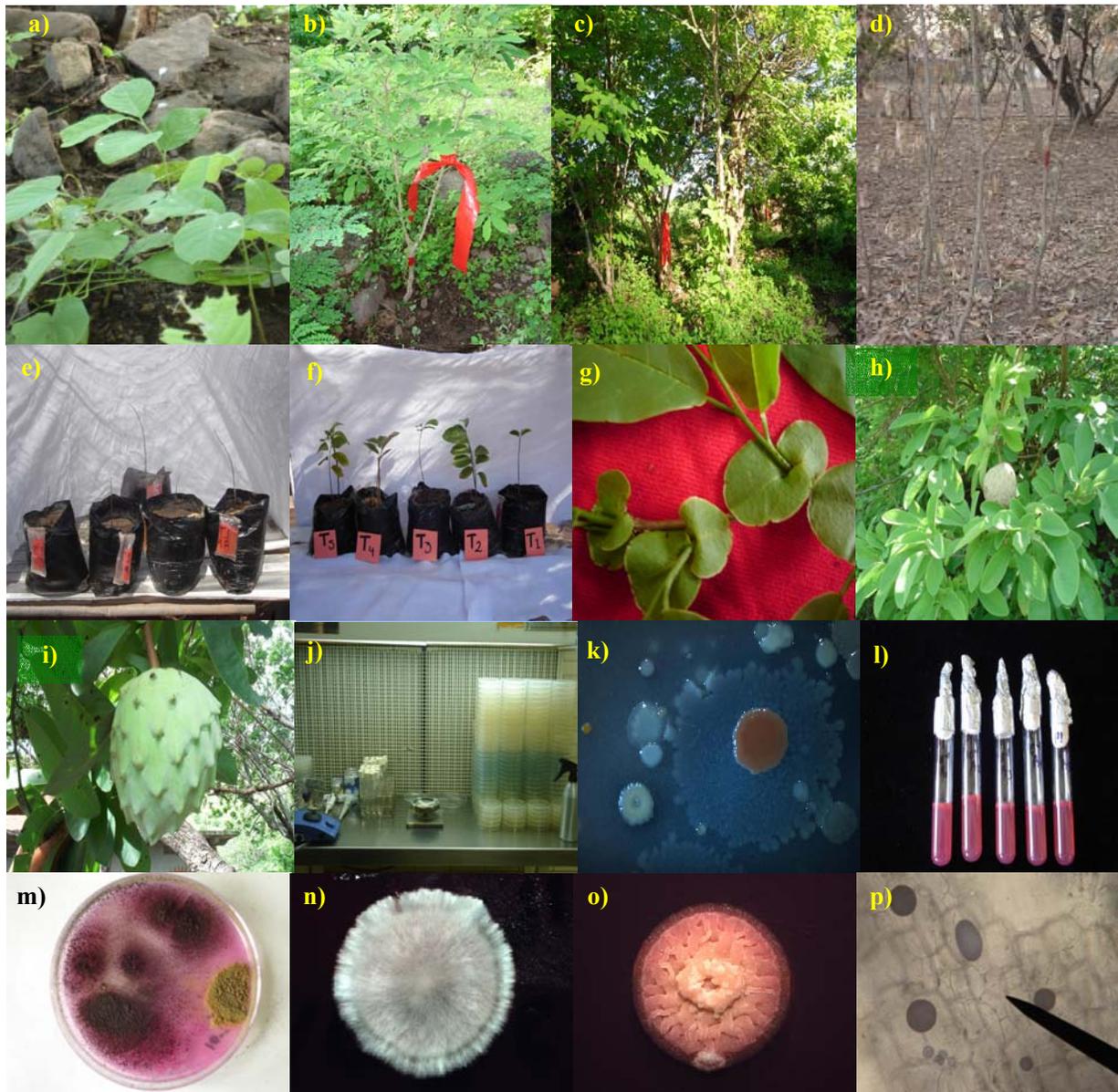
La cosecha del experimento se efectuó 20 y 22 semanas después del trasplante, para las plantas con y sin hojas, respectivamente. Las variables evaluadas fueron: i) altura, ii) diámetro del tallo; iii) número de hojas y/o cicatrices foliares; iv) peso seco de parte aérea, radical y total; v) contenido de nitrógeno total en parte aérea y radical, con la metodología de Bremner (1965); vi) contenido de fósforo en parte aérea y radical según Olsen *et al* (1954); vii) número de esporas en suelo rizosférico según la técnica de Gerdemann y Nicolson (1963) y viii) porcentaje de colonización micorrízica según Phillips y Hayman (1970), evaluándose arbusculos, vesículas e hifas. Adicionalmente, se evaluaron mediante conteo en plantas las UFC g<sup>-1</sup> de i) bacterias totales, ii) solubilizadoras de fosfatos y iii) celulolíticas presentes en la rizosfera de plantas con y sin follaje.

#### **4.2.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizó una distribución completamente al azar con cinco tratamientos y 12 repeticiones, lo cual originó 60 unidades experimentales. Los tratamientos consistieron en plantas: i) sin inocular; ii) inoculadas con el consorcio Zac-19; iii) inoculadas con *G. intraradices*; iv) inoculadas con *A. delicata* y v) inoculadas simultáneamente con el consorcio Zac-19; *G. intraradices* y *A. delicata*. A los datos que se obtuvieron en las diferentes variables evaluadas, se les realizaron un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). En el caso de los valores de colonización micorrízica, que se expresaron como porcentajes, los datos se transformaron y sus arcosenos se utilizaron en los análisis de varianza, así también se cuantificaron microorganismos los cuales fueron transformados a UFC g<sup>-1</sup> y posteriormente, a logaritmos que se utilizaron en los análisis de varianza. Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en las diferentes variables evaluadas se efectuaron los mismos procedimientos descritos para los datos de la fase de campo. Los datos se analizaron con el paquete estadístico SAS 6.03 (SAS Intitute, 1999).

**Cuadro 4.1.** Características físicas y químicas del suelo de San Antonio de las Huertas, Guerrero en el área de estudio y en el sustrato empleado en el experimento en vivero.

Características	Unidad	Procedencia del suelo	
		Suelo del área de estudio	Sustrato del experimento en vivero
Textura		Franco-arenoso	Franco-arenoso
Arena	%	57	57
Limo	%	24	27
Arcilla	%	19	16
pH		6.6	7.7
Materia orgánica	%	6.8	2.0
Conductividad eléctrica (1:5)	dS m <sup>-1</sup>	0.09	0.32
Nitrógeno total	%	0.34	0.10
P Olsen	ppm	20	44
K intercambiable	cmoles+Kg <sup>-1</sup>	0.5	1.1



**Figura 4.1.** Vistas generales del estudio efectuado en plantas de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) de tres edades: a) plantas de 1 a 8 meses; b) plantas de 1 a 3 años y c) plantas de 4 a 20 años; d) plantas de 1 a 3 años defoliadas en condiciones naturales; e) plantas defoliadas establecidas en vivero f) plantas no defoliadas establecidas en vivero; g) brácteas de plantas de ilama h) hojas y fruto de ilama; i) acercamiento del fruto de ilama; j) vista general del aislamiento microbiológico en condiciones axénicas; k) bacterias solubilizadoras de fosfato cultivadas en medio Picovskaya, en donde se aprecia el halo de solubilización; l) medio semisólido para *Azospirillum* spp.; m) medio sólido de papa dextrosa agar utilizado para evaluar poblaciones de hongos; n) hongo de brácteas de ilama; o) levadura de hojas; p) vesícula de hongos micorrízico arbusculares.

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Colonización micorrízica en campo**

Existió una conspicua variación en la dinámica estacional de las estructuras micorrízicas estudiadas (Cuadro 4.2). En términos generales las mayores colonizaciones micorrízicas totales se registraron en las épocas cuando las plantas tenían hojas y existió mayor precipitación (agosto y octubre). Independientemente de la edad de las plantas, los menores porcentajes de arbusculos se presentaron siempre en plantas con defoliación completa en la época de sequía (marzo), mientras que los mayores porcentajes de dichas estructuras se registraron en las plantas con hojas en las épocas de mayor precipitación (agosto y octubre). Los mayores porcentajes de vesículas se observaron en la etapa previa a la defoliación y sequía (octubre). En el caso de las hifas, la mayor proporción fue registrada en las plantas defoliadas en épocas de sequía (enero y marzo). El mayor porcentaje de colonización por hongos endófitos distintos de los micorrízicos se observó siempre, independientemente de la edad de la planta, en plantas defoliadas en la época sin precipitación (marzo).

#### **4.3.2. Poblaciones de microorganismos**

Se observaron variaciones en las UFC registradas en medios sólidos en los cuatro muestreos efectuados. En términos generales, se observaron dos tendencias: i) Las UFC de hongos totales y actinomicetos fueron más abundantes en la rizosfera de plantas defoliadas en época de secas (marzo), independientemente de la edad de los árboles, por ejemplo las UFC de actinomicetos registrados en el mes de marzo considerando las tres edades de árboles fueron conspicuamente superiores a las registradas en el mes de agosto ( $21 \times 10^6$  versus  $13 \times 10^6$  UFC por g de suelo seco;  $n=9$ ;  $p=0.05$ ) y ii) Las UFC de bacterias totales y bacterias solubilizadores de fosfatos (Cuadro 4.3) y las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en general (Cuadro 4.4) fueron más abundantes en la rizosfera de plantas con hojas en época de mayor precipitación (agosto) comparadas con plantas parcialmente o totalmente defoliadas en las épocas de menor o nula precipitación. Por ejemplo las UFC de bacterias en el medio de Rennie (1980) (fuente combinada de carbono) registradas en el mes de agosto, considerando las tres edades de árboles, fueron evidentemente superiores a las registradas en el mes de marzo ( $44 \times 10^6$  versus  $14 \times 10^5$  UFC por g de suelo seco;  $n=9$ ;  $p=0.05$ ).

### **4.3.3. Inoculación de cepas micorrízicas en invernadero**

En el caso del ensayo en invernadero, no existieron diferencias en el peso seco total, altura (Cuadro 4.5) diámetro del tallo, clorofila a y b, y clorofila total (Cuadro 4.6) entre las plantas inoculadas y las no inoculadas. Esto a pesar de que la colonización micorrízica fue relativamente alta y varió de 41 a 70% (Cuadro 4.5). Sin embargo, al comparar las colonizaciones totales entre plantas con hojas y aquellas defoliadas naturalmente, se observó que de acuerdo a las cepas de hongos micorrízico arbusculares inoculadas existieron o no diferencias estadísticas, (Cuadro 4.5). Por ejemplo cuando se inoculó con *G. intraradices* o *A. delicata* las colonizaciones totales no fueron estadísticamente distintas. Sin embargo, una tendencia contraria se observó cuando se inoculó con el consorcio Zac-19 o con todas las cepas.

En estos últimos casos la colonización total fue conspicuamente superior en las plantas que poseían follaje comparándose con aquellas carentes de él. Las UFC de bacterias solubilizadoras de fosfatos, celulolíticas y aquellas que crecieron en el medio de Rennie (1980) (fuente combinada de carbono), fueron en términos generales, menores en plantas con follaje comparadas con aquellas que carecían de él (Cuadro 4.5). Se detectaron excepciones a esta generalización, por ejemplo en bacterias solubilizadoras de fosfatos o celulolíticas en plantas inoculadas con *G. intraradices* y consorcio Zac-19, respectivamente (Cuadro 4.5).

### **4.3.4. Contenido nutrimental en parte aérea y radical en plantas de ilama defoliadas y no defoliadas**

Con respecto al contenido nutrimental de la parte aérea de las plantas de ilama establecidas en invernadero el contenido de nitrógeno en los diferentes tratamientos fue mayor en plantas inoculadas con el consorcio (Gi+Ac+Zac-19), en comparación con los demás tratamientos, y el contenido de nitrógeno fue mayor en plantas con follaje. Lo cual, indica que el contenido de nitrógeno es afectado por la defoliación natural de las plantas y también por el tipo de cepa micorrízica. El contenido de nitrógeno en la parte radical fue mayor en plantas con follaje para todos los tratamientos a excepción de las plantas que fueron inoculadas con *G. intraradices* y el consorcio Zac-19 (Cuadro 4.6).

**Cuadro 4.2.** Porcentaje de estructuras micorrízicas y de hongos endófitos y frecuencia de esporulación intrarradical en plantas de “ilama” (*Annona diversifolia* Saff.) de tres edades, en cuatro estadios fenológicos.

Edades	Estadio fenológico de las plantas ¶			
	I	II	III	IV
Plantas de 1 a 8 meses				
Colonización total	95.6a	64.3c	89.0b	42.6d
Arbúsculos	90.8a	53.5a	37.5b	0
Vesículas	5.2b	13.4a	0	0
Hifas	38.5c	13.0d	84.3a	42.3b
Esporas intrarradicales	25.3	52.0	6.7	4.8
Hongos endófitos	38.3c	40.1c	62.4b	95.0a
Plantas de 1 a 3 años				
Colonización total	85.3c	82.6d	98.1a	94.0b
Arbúsculos	73.3a	78.8a	52.8b	0
Vesículas	9.3b	29.1a	12.7b	0
Hifas	70.9b	14.4c	85.2a	93.4a
Esporas intrarradicales	16.0	33.3	4.0	36.0
Hongos endófitos	62.9b	24.1d	39.7c	93.4a
Plantas de 4 a 20 años				
Colonización total	95.6a	84.2c	87.4b	68.1d
Arbúsculos	89.1a	78.7a	47.9b	0
Vesículas	14.5b	26.2 a	19.8a	0
Hifas	67.0b	1.2c	67.0b	68.0a
Esporas intrarradicales	9.3	54.7	7.1	0
Hongos endófitos	81.7b	20.9d	37.9c	92.5a

¶ I: llenado de fruto (mes de agosto); II: presencia de frutos maduros (mes de octubre); III: inicio de defoliación (mes de enero); IV: defoliación completa y formación de yemas nuevas (mes de marzo). Valores en la misma fila con la misma letra no son diferentes según Tukey ( $p=0.05$ ).  $n=3$ .

**Cuadro 4.3.** Poblaciones de microorganismos aislados de rizosfera de plantas de “ilama” (*Annona diversifolia* Saff.) de tres edades, en cuatro estadios fenológicos.

Edades y medios de cultivo sólido	Estadio fenológico de las plantas			
	I ¶	II	III	IV
	Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco			
Plantas de 1 a 8 meses				
Papa Dextrosa Agar ¶¶	41.80 x 10 <sup>5</sup> c	15.60 x 10 <sup>4</sup> d	15.61 x 10 <sup>6</sup> b	56.40 x 10 <sup>7</sup> a
Czapeck	13.90 x 10 <sup>5</sup> b	55.30 x 10 <sup>6</sup> a	41.13 x 10 <sup>6</sup> a	15.45 x 10 <sup>6</sup> a
Agar nutritivo	84.40 x 10 <sup>7</sup> a	55.30 x 10 <sup>5</sup> c	18.61x 10 <sup>6</sup> b	12.38x 10 <sup>4</sup> d
Picovskaya	58.70 x 10 <sup>7</sup> a	28.00 x 10 <sup>7</sup> a	16.36 x 10 <sup>6</sup> b	21.74 x 10 <sup>6</sup> b
Plantas de 1 a 3 años				
Papa Dextrosa Agar	12.80 x 10 <sup>6</sup> b	12 .00 x 10 <sup>5</sup> c	58.40 x 10 <sup>5</sup> c	56.79 x 10 <sup>7</sup> a
Czapeck	39.80 x 10 <sup>4</sup> b	48.2 x 10 <sup>5</sup> a	14.55 x 10 <sup>6</sup> a	14.30 x 10 <sup>6</sup> a
Agar nutritivo	39.30 x 10 <sup>6</sup> a	64.3 x 10 <sup>6</sup> b	10.86 x 10 <sup>5</sup> c	18.37 x 10 <sup>4</sup> d
Picovskaya	35.00 x 10 <sup>5</sup> a	24.7 x 10 <sup>6</sup> b	93.23 x 10 <sup>4</sup> c	15.72 x 10 <sup>5</sup> c
Plantas de 4 a 20 años				
Papa Dextrosa Agar	13.30 x 10 <sup>7</sup> a	69.60 x 10 <sup>5</sup> b	19.10 x 10 <sup>4</sup> c	65.82 x 10 <sup>7</sup> a
Czapeck	10.00 x 10 <sup>6</sup> b	62.10 x 10 <sup>8</sup> a	22.93 x 10 <sup>7</sup> ab	10.13 x 10 <sup>8</sup> a
Agar nutritivo	65.50 x 10 <sup>7</sup> a	83.70 x 10 <sup>6</sup> b	63.69 x 10 <sup>6</sup> b	72.52 x 10 <sup>5</sup> b
Picovskaya	12.20 x 10 <sup>6</sup> b	44.60x 10 <sup>7</sup> a	13.68 x 10 <sup>5</sup> c	14.94 x 10 <sup>6</sup> b

¶ I: llenado de fruto (mes de agosto); II: presencia de frutos maduros (mes de octubre); III: inicio de defoliación (mes de enero); IV: defoliación completa y formación de yemas nuevas (mes de marzo). ¶¶ PDA: papa dextrosa agar con rosa de bengala (Beever y Bollard, 1970) utilizado para evaluar hongos totales; czapeck utilizado para evaluar actinomicetos; agar nutritivo utilizado para evaluar bacterias totales; picovskaya (Picovskaya, 1948) utilizado para evaluar bacterias solubilizadoras de fosfatos. Valores en la misma fila con la misma letra no son diferentes según Tukey (p=0.05). n=3.

**Cuadro 4.4.** Poblaciones bacterianas fijadoras de nitrógeno de vida libre aisladas de rizosfera de “ilama” (*Annona diversifolia* Saff.) de tres edades, en cuatro estadios fenológicos.

Edades y medios de cultivo sólido	Estadio fenológico de las plantas			
	I¶	II	III	IV
	Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco			
Plantas de 1 a 8 meses				
NFB¶¶	10.30 x 10 <sup>6</sup> a	85.80 x 10 <sup>6</sup> a	22.10 x 10 <sup>4</sup> c	62.49 x 10 <sup>5</sup> b
FCC	59.70 x 10 <sup>7</sup> a	26.50 x 10 <sup>6</sup> b	10.41 x 10 <sup>5</sup> c	16.62 x 10 <sup>5</sup> c
LG ( <i>Azotobacter</i> spp.)	99.40 x 10 <sup>6</sup> a	94.60 x 10 <sup>5</sup> b	10.32 x 10 <sup>5</sup> b	15.35 x 10 <sup>5</sup> b
LG ( <i>Beijerenckia</i> spp.)	69.60 x 10 <sup>7</sup> a	13.50 x 10 <sup>6</sup> b	27.66 x 10 <sup>6</sup> b	24.51 x 10 <sup>7</sup> a
LG ( <i>Derxia</i> spp.)	14.50 x 10 <sup>6</sup> a	19.70 x 10 <sup>6</sup> c	71.67 x 10 <sup>6</sup> b	35.46 x 10 <sup>6</sup> b
Plantas de 1 a 3 años				
NFB	49.00 x 10 <sup>4</sup> b	21.20 x 10 <sup>6</sup> a	17.88 x 10 <sup>3</sup> d	11.25 x 10 <sup>4</sup> c
FCC	26.60 x 10 <sup>6</sup> a	53.50 x 10 <sup>6</sup> a	17.82 x 10 <sup>5</sup> b	14.73 x 10 <sup>5</sup> b
LG ( <i>Azotobacter</i> spp.)	9.50 x 10 <sup>6</sup> a	15.80 x 10 <sup>4</sup> c	94.87 x 10 <sup>5</sup> b	85.93 x 10 <sup>4</sup> d
LG ( <i>Beijerenckia</i> spp.)	20.20 x 10 <sup>6</sup> a	18.40 x 10 <sup>4</sup> c	23.76 x 10 <sup>4</sup> c	55.13 x 10 <sup>5</sup> b
LG ( <i>Derxia</i> spp.)	39.80 x 10 <sup>7</sup> a	20.80 x 10 <sup>4</sup> d	42.15 x 10 <sup>6</sup> b	55.13 x 10 <sup>5</sup> c
Plantas de 4 a 20 años				
NFB	55.00 x 10 <sup>7</sup> a	39.00 x 10 <sup>7</sup> a	20.94 x 10 <sup>5</sup> c	14.33 x 10 <sup>6</sup> b
FCC	46.10 x 10 <sup>6</sup> b	12.20 x 10 <sup>7</sup> a	11.18 x 10 <sup>5</sup> c	10.22 x 10 <sup>5</sup> c
LG ( <i>Azotobacter</i> spp.)	13.70 x 10 <sup>6</sup> a	11.00 x 10 <sup>4</sup> c	13.70 x 10 <sup>5</sup> b	11.00 x 10 <sup>4</sup> c
LG ( <i>Beijerenckia</i> spp.)	34.00 x 10 <sup>6</sup> a	10.50 x 10 <sup>5</sup> b	34.00 x 10 <sup>5</sup> b	10.50 x 10 <sup>6</sup> a
LG ( <i>Derxia</i> spp.)	27.80 x 10 <sup>6</sup> a	24.50 x 10 <sup>4</sup> c	12.13 x 10 <sup>6</sup> a	35.63 x 10 <sup>5</sup> b

¶ I: llenado de fruto (mes de agosto); II: presencia de frutos maduros (mes de octubre); III: inicio de defoliación (mes de enero); IV: defoliación completa y formación de yemas nuevas (mes de marzo). ¶¶ NFB: medio de malato libre de nitrógeno (Baldani *et al.*, 1986) utilizado para evaluar fijadoras de nitrógeno de vida libre. FCC: fuente combinada de carbono (Rennie, 1980) utilizado para evaluar bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Medio LG: medio para *Azotobacter* spp., *Beijerenckia* spp. y *Derxia* spp, medios específicos utilizados para evaluar bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (Lipman, 1903). Valores en la misma fila con la misma letra no son diferentes según Tukey (p=0.05). n=3. Cabe mencionar que los medios utilizados para evaluar las poblaciones bacterianas fijadoras de nitrógeno, no son 100% selectivos, por lo tanto las poblaciones evaluadas son afines a los géneros citados.

**Cuadro 4.5.** Efecto de la inoculación con hongos micorrízico arbusculares en el crecimiento, colonización y número de esporas y microorganismos rizosféricos de plantas de “ilama” (*Annona diversifolia* Saff.), crecidas en invernadero durante 22 semanas.

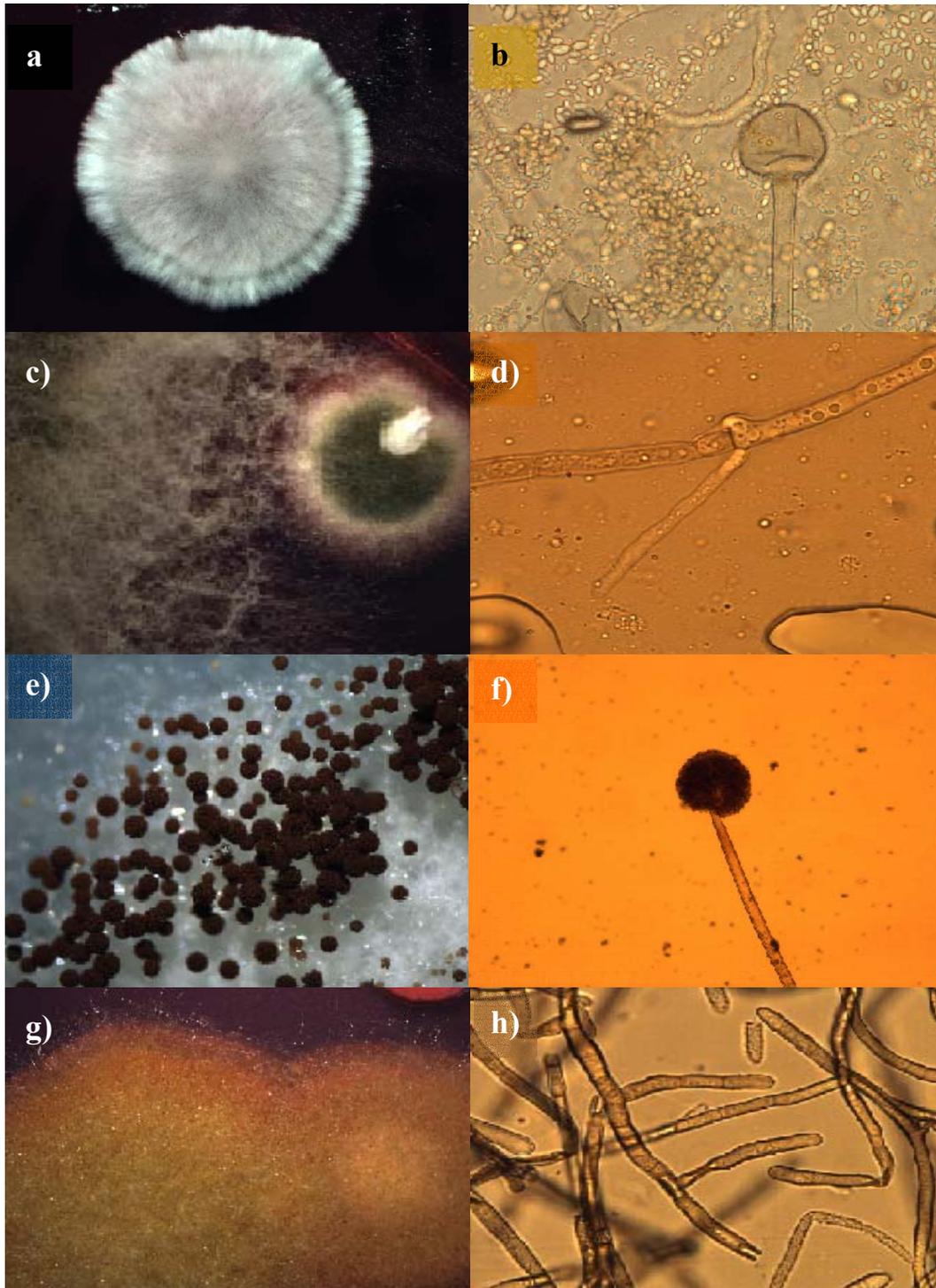
Variables	Cepas de hongos <sup>1</sup>				
	T	Gi	Ad	Zac-19	Gi + Ad + Zac-19
cm					
Diámetro del tallo <sup>2</sup>					
Con follaje	1.0a	0.7a	1.0a	1.0a	0.8a
Sin follaje	1.0a	1.0a	1.0a	0.9a	0.9a
g					
Peso seco total <sup>2</sup>					
Con follaje	1.4a	1.1a	1.3a	1.5a	1.9a
Sin follaje	0.7a	1.0a	0.8a	0.6a	0.8a
%					
Colonización total					
Con follaje	0.0a	41.2a	41.7a	70.2a	69.4a
Sin follaje	0.0a	21.0a	27.3a	16.3b	19.2b
Número de esporas por 100 g de suelo rizosférico					
Con follaje	29a	35a	30a	30a	21a
Sin follaje	10b	30b	136a	169a	132a
UFC g <sup>-1</sup> de suelo seco					
Medios de cultivo <sup>3</sup>					
Picovskaya					
Con follaje	27.52 x 10 <sup>5</sup> b	14.21 x 10 <sup>6</sup> a	37.74 x 10 <sup>4</sup> b	79.85 x 10 <sup>4</sup> b	92.51 x 10 <sup>4</sup> b
Sin follaje	68.29 x 10 <sup>6</sup> a	84.52 x 10 <sup>5</sup> a	62.46 x 10 <sup>5</sup> a	88.44 x 10 <sup>5</sup> a	89.46 x 10 <sup>5</sup> a
Fuente combinada de carbono					
Con follaje	43.49 x 10 <sup>5</sup> b	26.30 x 10 <sup>5</sup> b	28.91 x 10 <sup>5</sup> a	27.22 x 10 <sup>5</sup> b	32.90 x 10 <sup>5</sup> b
Sin follaje	37.28 x 10 <sup>6</sup> a	46.40 x 10 <sup>6</sup> a	36.56 x 10 <sup>5</sup> a	68.81 x 10 <sup>6</sup> a	46.54 x 10 <sup>6</sup> a
Medio para bacterias celulolíticas					
Con follaje	70.66 x 10 <sup>5</sup> b	47.55 x 10 <sup>5</sup> b	34.66 x 10 <sup>5</sup> b	54.73 x 10 <sup>5</sup> a	40.71 x 10 <sup>5</sup> b
Sin follaje	17.60 x 10 <sup>6</sup> a	19.59 x 10 <sup>6</sup> a	15.95 x 10 <sup>6</sup> a	22.46 x 10 <sup>6</sup> a	47.61 x 10 <sup>6</sup> a

<sup>1</sup> T= testigo; Gi= *Glomus intraradices*; Ad= *Acaulospora delicata*; Zac-19= consorcio de las cepas *G. albidum*, *G. claroides* y *G. diaphanum*. <sup>2</sup> Las variables evaluadas fueron de plantas cosechadas en dos fases: con follaje: promedios de 120 días después del trasplante; sin follaje: promedios de 140 días después del trasplante. <sup>3</sup> Medio de fuente combinada de carbono (según Rennie, 1980) utilizado para evaluar bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre; medio de Picovskaya (según Picovskaya, 1948) utilizado para evaluar bacterias solubilizadoras de fosfatos; medio para bacterias celulolíticas (Suyama *et al.*, 1993). Valores de la misma línea con la misma letra o son diferentes e acuerdo con Tukey (p=0.05) n=3.

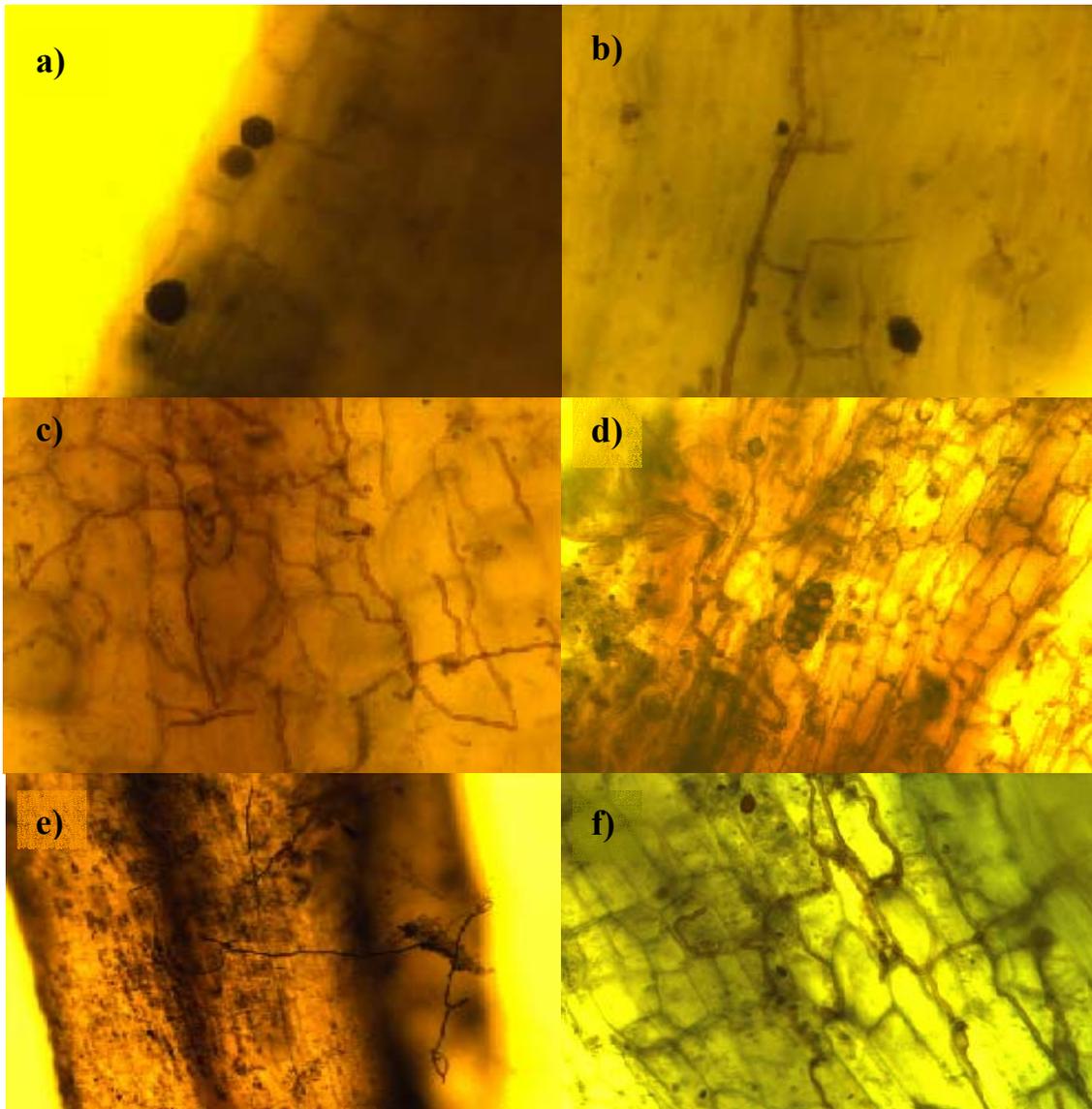
**Cuadro 4.6.** Contenido nutrimental de la parte aérea y radical de “ilama” (*Annona diversifolia* Saff.), crecidas durante 22 semanas en invernadero, inoculadas con hongos micorrízico arbusculares.

Determinación	T	Gi	Ad	Zac-19	Gi + Ad + Zac-19
	mg planta <sup>-1</sup>				
Parte aérea¶					
Contenido de nitrógeno					
Con follaje	17.43a	20.40a	15.30a	26.30 a	32.13a
Sin follaje	10.70a	12.06b	12.50a	6.96b	12.73b
Contenido de fósforo					
Con follaje	1.034a	1.160a	1.046a	2.025a	2.268a
Sin follaje	0.437b	0.488b	0.390b	0.309b	0.480b
Parte radical¶					
Contenido de nitrógeno					
Con follaje	3.33a	2.73a	3.15a	3.63a	7.00a
Sin follaje	1.90b	3.58a	2.60b	3.03a	1.93b
Contenido de fósforo					
Con follaje	0.524a	0.548a	0.485b	0.583a	0.913a
Sin follaje	0.304b	0.448a	0.662a	0.417a	0.258a
	unidades de absorbancia óptica				
Clorofila A	0.220a	0.216a	0.762a	0.118a	0.078a
Clorofila B	3.070a	5.57a	3.213a	5.092a	2.625a
Clorofila total	0.160a	0.434a	1.425a	0.308a	0.200a

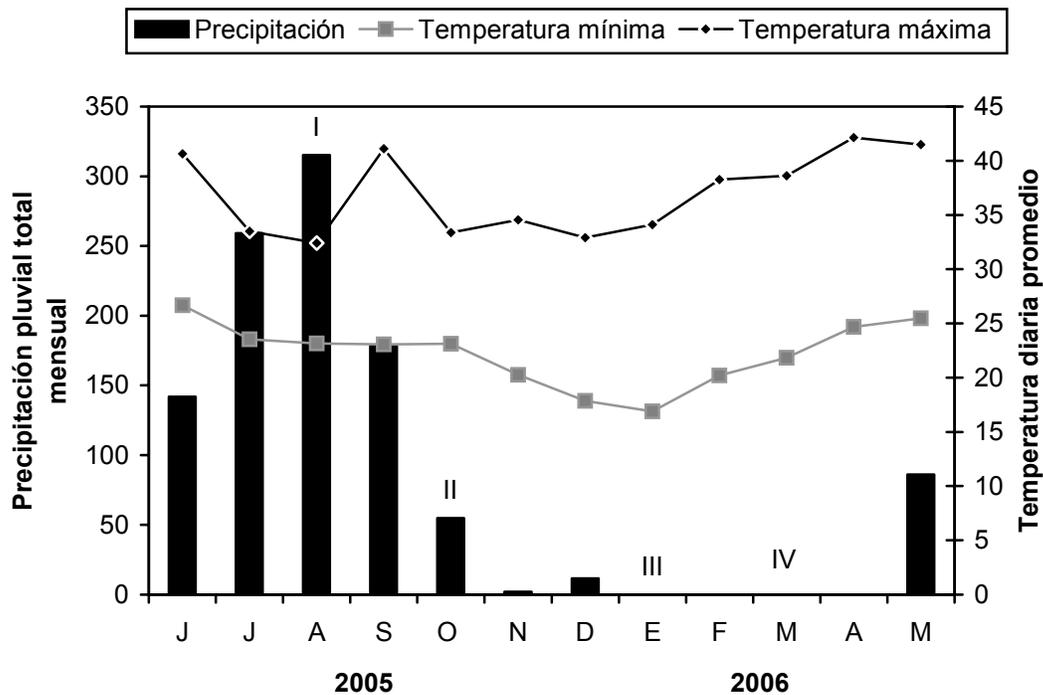
T= testigo; Gi= *Glomus intraradices*; Ad= *Acaulospora delicata*; Zac-19= consorcio de las cepas *G. albidum*, *G. claroides* y *G. diaphanum*.



**Figura 4.2.** Macromorfología y micromorfología de hongos de plantas de ilama: a) macrofotografía de conidióforo de *Oedocephalum* sp.; b) microfotografía de *Oedocephalum* sp.; c) colonia de hongo mucoral; d) fibula de Basidiomycete; e) conidióforos de *Aspergillus* sp.; f) microfotografía de conidióforo de *Aspergillus* sp.; g) vista de la colonia del mucoral *Tricladium* sp.; h) vista microscópica de *Tricladium* sp.



**Figura 4.3.** Estructuras micorrízicas y endofíticas en raíces de ilama (*Annona diversifolia* Saff.): a) esporas de hongos micorrízico arbusculares (HMA) encontradas en células corticales; b) hifas septadas de hongos endófitos; c) hifas endofíticas en células corticales; d) microesclerocio de hongos endófitos; e) hifas intra y extraradicales de HMA; f) hifas de endofitos intraradicales.



**Figura 4.4.** Precipitación pluvial y temperaturas máximas y mínimas en Ciudad Altamirano, Guerrero durante la recolecta de muestras en plantas de ilama en las diferentes etapas fenológicas: I: follaje completo y llenado de fruto (mes de agosto); II: follaje completo y presencia de frutos maduros (mes de octubre); III: inicio de defoliación y presencia de hojas senescentes (mes de enero); IV: defoliación completa y formación de yemas nuevas (mes de marzo).

El contenido de fósforo en la parte aérea de plantas de ilama presentó diferencias estadísticas en el contenido de fósforo en las plantas con follaje y sin follaje. Los mayores contenidos de fósforo se presentaron en plantas con follaje. El mayor contenido de fósforo se obtuvo en plantas inoculadas con el consorcio (Gi+Ac+Zac-19), demostrándose así que el contenido de fósforo es afectado por la defoliación natural en plantas de ilama (Cuadro 4.6). El contenido de fósforo en la parte radical en plantas con y sin follaje no presentó diferencia estadística, lo cual sugiere que la defoliación no afecta el contenido de fósforo en la parte radical para plantas de ilama (Cuadro 4.6).

## 4.4. Discusión

### 4.4.1. Efecto de la defoliación sobre la colonización micorrízica

El efecto de la defoliación inducida artificialmente u originada por herbivoría sobre la micorriza fue compilado por Gehring y Whitham (1994) dichos autores señalaron que de 34 especies estudiadas que forman micorriza vesículo-arbuscular solo 22 tuvieron un efecto negativo en la colonización micorrízica como consecuencia de la defoliación. Más recientemente otros estudios han encontrado dicho efecto. Por ejemplo Gange *et al.* (2002) reportaron que en condición de campo la herbivoría de insectos puede reducir la colonización micorrízica de *Platago lanceolata* en 56%. La mayoría de las especies de plantas en las que se ha estudiado dicho efecto de la defoliación son pastos. Hasta donde conocemos, el efecto de la defoliación en los hongos micorrízico arbusculares en árboles tropicales como son las plantas de ilamas, no se ha estudiado. En términos generales, se ha considerado que la disminución de follaje origina un decremento en la colonización micorrízica (Bethlenfalvay *et al.*, 1985; Trent *et al.*, 1988; Gehring y Whitham, 1994). En nuestro caso, se observó una dramática disminución en el porcentaje de arbusculos y vesículas en los árboles de ilama defoliadas naturalmente en campo, en comparación con aquellos con follaje. De manera similar las plantas de ilama con follaje crecidas en invernadero presentaron, en términos generales mayores colonizaciones que aquellos que carecían de él. Allsopp (1998) estudió el efecto de la defoliación en la colonización micorrízica de tres especies de pasto pertenecientes a los géneros *Digitaria*, *Lolium* y *Themeda*. Este autor encontró que como resultado de la defoliación existió una conspicua disminución en la colonización micorrízica total, en las tres especies de plantas estudiadas. En nuestro caso, en el ensayo en invernadero, se observó de manera similar a lo encontrado por Allsopp (1998) una disminución en la colonización micorrízica total como resultado de la defoliación. Esta disminución fue más evidente cuando las plantas de ilama fueron inoculadas con el consorcio de cepas micorrízica arbusculares Zac-19, existiendo una disminución de colonización micorrízica total de 77%.

En función de los resultados observados en invernadero, se puede asumir que la reducción de la colonización micorrízica resultado de la defoliación, depende de las especies fúngicas involucradas. En nuestro caso se observó una dramática reducción en la colonización total, como consecuencia de la defoliación, en dos de los cuatro tratamientos de hongos micorrízicos

arbusculares inoculados. Saito *et al.* (2004) estudiaron los efectos de la defoliación en la estructura de comunidades de hongos micorrízicos arbusculares basados en secuencias de genes 18S rDNA. Estos autores encontraron, que algunas clases de *Glomus sp.*, disminuyeron dramáticamente la longitud de la raíz colonizada como consecuencia de la defoliación. Adicionalmente sugirieron que los grupos fúngicos de hongos micorrízicos arbusculares poseen diferentes requerimientos de carbohidratos procedentes de las plantas hospederas asociadas. A pesar de que en nuestro caso no se efectuó una caracterización de la estructura de comunidades de hongos micorrízico arbusculares que infectaban a los árboles de ilama en campo, previamente Saito *et al.* (2004) han reportado que existen grupos de hongos micorrízico arbusculares que son significativamente afectados por la defoliación. Si existiesen comunidades de hongos micorrízicos arbusculares diversos en nuestro caso, esto podría explicar la disminución del porcentaje de estructuras micorrízicas, como arbusculos o vesículas, como consecuencia de la defoliación en condiciones naturales. Para el caso de la colonización endofítica, las mayores colonizaciones se encontraron en los estadios fisiológicamente inactivos de ilama (plantas completamente defoliadas). Lo cual, sugiere que estos microorganismos realizan importantes funciones ecofisiológicas en estos estadios de inactividad. Similar a lo encontrado en este trabajo, Barrow y Aaltonen (2001) encontraron que la colonización endofítica en *Atriplex canescens* (Pursh) era más abundantes en raíces de plantas inactivas y relativamente inactivas.

#### **4.4.2. Efecto de la estacionalidad sobre la colonización micorrízica**

El porcentaje de colonización micorrízica en condiciones naturales se encuentra influenciado por diversos factores dentro de los cuales se incluyen: i) condiciones ambientales, tales como humedad y temperatura del suelo, ii) fenología y estadio fisiológico de las plantas hospederas y iii) tasa de crecimiento radical y fúngico (Brundrett, 2002). En nuestro caso, los mayores porcentajes de colonización micorrízica total se observaron (en el caso de las plantas muy jóvenes y maduras) en la época de mayor precipitación (agosto) en comparación con las épocas con menor o sin precipitación. Una tendencia similar fue registrada recientemente por Ramos-Zapata *et al.* (2006) para la palma *Desmoncus orthacanthus* Martius, en un bosque tropical perenne maduro. Dichos autores, encontraron que los mayores porcentajes de colonización micorrízica, en condiciones naturales para cuatro estadios definidos de crecimiento de esta palma, se presentaron en las épocas de mayor precipitación.

Adicionalmente, se ha considerado con frecuencia que un indicador más preciso que la colonización micorrízica total es la presencia de arbusculos (McGonigle *et al.*, 1990; Gange y Ayres, 1999), a pesar de que éstas son estructuras muy efímeras, cuya duración puede ser de tres a siete días (Mohammad *et al.*, 1998). En nuestro caso se observó, un mismo patrón de distribución de colonización por arbusculos, independientemente del estadio de las plantas. Los mayores porcentajes de arbusculos fueron observados en las épocas de mayor precipitación y también se observó una marcada reducción de presencia de arbusculos en las épocas sin precipitación. De hecho en la época en la cual existió una defoliación completa (enero) no se detectó presencia de arbusculos, en ninguno de los estadios vegetales estudiados. Debido a que los arbusculos son estructuras que están involucradas directamente en la traslocación nutrimental de la interfase planta-hongo (Smith y Read, 1997), la ausencia de arbusculos en la época sin precipitación, podría ser indicador entonces de una ausencia de translocación substancial de N y P del suelo a las plantas de ilama, vía hongos micorrízicos. Esto parece lógico para plantas carentes de hojas en un ambiente sin agua, independientemente de su edad. En contraste, los mayores porcentajes de arbusculos, registrados en la época de mayor precipitación, correspondieron a la época de llenado de fruto, época en la cual la demanda nutrimental de las plantas de ilama es considerablemente alta.

#### **4.4.3. Efecto de la estacionalidad sobre la esporulación micorrízica en suelo rizosférico**

La esporulación de los hongos micorrízico arbusculares esta influenciado por diversos factores dentro de los que se incluyen: i) estacionalidad; ii) factor edáfico, iii) factores ambientales y iv) respuestas fisiológicas de las plantas hospederas (Brundrett, 2002). En nuestro caso se observó la mayor cantidad de esporas en condiciones naturales en suelo rizosférico en la época sin precipitación antes del incremento de temperaturas (mes enero), independientemente de la edad de las plantas. Las plantas de 1 a 8 meses, de 1 a 3 años y de 4 a 20 años, registraron 2.5, 3.0 y 13.2 esporas por g de suelo en esta época, respectivamente. Lovelock *et al.* (2003) al estudiar una selva tropical lluviosa en Costa Rica, encontraron de manera similar que algunas especies fúngicas de hongos micorrízico arbusculares esporulan profusamente en épocas secas. En la época cuando no existió precipitación se dieron incrementos substanciales de temperatura por ejemplo de 34.11 a 38.62 de temperatura diaria promedio, existió una dramática disminución dado que se registraron 0.3, 0.6 y 0.4 esporas por gramo de suelo rizosféricos para las edades de

1 a 8 meses, 1 a 3 años y 4 y 30 años respectivamente. Camargo-Ricalde *et al.* (2005) reportaron una tendencia opuesta con relación al número de esporas de hongos micorrízicos arbusculares a la encontrada en el presente trabajo. Estos autores estudiaron un valle semi-árido y registraron una mayor cantidad de esporas en la época húmeda comparada con la época seca.

Otro factor que pudo influir tanto en la colonización micorrízica, en términos de arbusculos y vesículas, como en la esporulación de hongos micorrízicos en nuestro caso, fue la temperatura de los meses muestreados. Las mayores temperaturas se alcanzan en marzo y es en esta fecha de muestreo en donde no se detectaron arbusculos o vesículas, independiente de la edad de las plantas. En el caso del número de esporas en el suelo existieron variaciones substanciales en las distintas fechas de muestreo. Las reducciones mas dramáticas se apreciaron entre los meses de enero (con una temperatura diaria promedio de 25.5 °C) y marzo (con una temperatura diaria promedio de 30.2 °C) dado que el número de esporas en el suelo se redujo 87%, 80% y 67% para las edades de 1 a 8 meses, 1 a 3 años y 4 a 30 años, respectivamente. Previamente, diversos autores (Monz *et al.*, 1994; Gavito *et al.*, 2005) han estudiados la influencia de la temperatura en los hongos micorrízico arbusculares, y han encontrado que el incremento en temperatura afecta el crecimiento de algunas especies de hongos micorrízico arbusculares. Gavito *et al.* (2005) encontraron que a 30 °C algunos de las especies de HMA inhibieron su crecimiento de micelio externo.

#### **4.4.4. Efecto de la defoliación sobre la biomasa radical**

Allsop (1998) reportó que algunas especies de pastos responden a la defoliación con muerte masiva de raíz. En nuestro caso, se observó en los árboles de ilama con defoliación completa una evidente disminución en las cantidades de raíces cortas presentes comparadas con las observadas en árboles con follaje en condiciones de campo (datos no mostrados). La micorriza ha recibido escasa atención en el género tropical *Annona*. Hasta donde conocemos, este es el primer reporte donde se menciona el carácter micorrízico de la especie. Debido a los altos porcentajes de colonización micorrízica observados y a la gran variación estacional registrada en las estructuras micorrízicas, se puede considerar que una mayor comprensión de las relaciones micorrízicas de *Annona diversifolia* Saff., puede contribuir a mejorar la propagación y cultivo de esta especie tropical con fines económicos.

#### **4.4.5. Contenido nutrimental en parte aérea y radical en plantas defoliadas y no defoliadas**

En un estudio realizado por Mikola *et al.* (2005) encontraron que la defoliación ocasiona disminución de la biomasa del sistema radical. Asimismo, que con el tiempo la biomasa de la raíz, la concentración de N y la concentración de C disminuyen por la defoliación. En el presente trabajo al igual que Mikola se encontró, que el contenido de nitrógeno fue mayor en plantas de ilama no defoliadas. Lo cual, indica que el contenido de nitrógeno es afectado por la defoliación natural en las plantas de ilama. Se observó la misma tendencia para la parte radical en donde el contenido de nitrógeno fue mayor en plantas no defoliadas para todos los tratamientos.

Allsopp (1998) evaluó el efecto de la defoliación sobre las concentraciones de fósforo en hojas de plantas de *Digitaria*, *Lolium* y *Themeda*. Encontró que la concentración de fósforo en *Themeda* se vio afectada por la defoliación, para el caso de *Digitaria* y *Lolium* no se observó reducción. En el presente trabajo los mayores contenidos de fósforo en la parte aérea de plantas de ilama se presentaron en plantas no defoliadas. Para el contenido de fósforo en la parte radical de plantas de ilama con y sin follaje no se observó efecto alguno por la defoliación. En general, los microorganismos rizosféricos de ilama no han sido estudiados previamente a pesar de la enorme importancia funcional en el abastecimiento de nutrientes a dicha planta.

Sería altamente deseable el desarrollo de los siguientes tipos de estudios: i) relaciones fisiológicas entre hongos y otros grupos de microorganismos de importancia funcional como bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfatos y productoras de sideróforos; ii) identificar taxonómicamente preferentemente con métodos de biología molecular la biodiversidad de hongos micorrízico arbusculares asociados con planta de ilama; iii) estudiar la abundancia de micelio externo micorrízicos y su importancia funcional.

#### **4.5. Conclusiones**

La colonización micorrízica total en plantas de campo de ilama al igual a las establecidas en vivero fue severamente afectada por la defoliación. Asimismo, se observó que la colonización micorrízica se encuentra afectada por las altas temperaturas y sequía. La densidad de esporas no es afectada en plantas de ilama defoliadas establecidas en campo y vivero.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato, son afectadas por la defoliación y por la sequía en plantas de ilama establecidas en campo. Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en plantas de ilama establecidas en invernadero no se ven afectadas por la defoliación. Las bacterias celulolíticas no son afectadas por la defoliación en plantas establecidas en invernadero.

Las poblaciones de hongos y actinomicetes no se ven afectadas por la defoliación y sequía. La estacionalidad junto con la defoliación influye negativamente sobre las poblaciones y la variabilidad microbiana del suelo.

#### 4.6. Literatura citada

- Alarcón, A.; Pérez-Moreno, J. y Ferrera-Cerrato, R. Mycorrhizae in tropical agriculture. *In: Mycorrhizae in Crop Production*, eds. C. Hamel and C. Plenchette, 2007: 197-238.
- Allsopp, N. 1998. Effect of defoliation on the arbuscular mycorrhizas of three perennial pasture and rangeland grasses. *Plant and Soil* 202: 117-124.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D.n y Dobereiner., J. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst.Bacteriol.*36:86-93.
- Barrow, J. y Aaltonen, R. 2001. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza* 11: 199-205.
- Beever, R. y Bollard, E. 1970. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *J. Gen. Microbiol.* 60: 273-279.
- Bethlenfalvay, G. J., Evans, R. A. y Lesperance, A. L. 1985. Mycorrhizal colonization of crested wheatgrass as influenced by grazing. *Agronomy journal* 77:233-236.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. pp. 1149-1178. *In: Black, C,A, (Ed.). Methods of soil analysis. Part 2 .Agronomy 9. American Society of Agronomy Madison, WI.*
- Brundrett, M. C. 2002. Co-evolution of roots an mycorrhizas of land plants. *New Phytologist.* 154:275-304.

- Camargo-Ricalde, S. L. y Esperon-Rodríguez, M. 2005. Effect of the spatial and seasonal soil heterogeneity over arbuscular mycorrhizal fungal spore abundance in the semi-arid valley of Tehuacan-Cuicatlan, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 3-4: 339-352.
- Chamizo, A., Ferrera-Cerrato, R. y Varela, L. 1998. Identificación de especies de un consorcio del género *Glomus*. *Revista Mexicana de Micología* 14: 37-40.
- FAO. 1994. Neglected Crops: 1492 from a different perspective. pp. 47-62. *In*: J. E. Hernando Bermejo and J. León (ed.). *Plant Production and Protection*. Rome, Italy.
- Ferrera-Cerrato, R., González-Chávez, M. C. A. y Rodríguez-Mendoza, M. N. 1993. Manual de agromicrobiología. Ed. Trillas, primera edición. México. pp: 64-74.
- Gange, A. C. y Ayres R. 1999. On the relation between arbuscular mycorrhizal colonization and plant "benefit". *Oikos* 87: 615-621.
- Gange, C. A., Bower, E. y Brown K. V. 2002. Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonization. *Oecología* 131: 103-112.
- Gavito, M. E., Olsson, P. A., Rouhier, H., Medina-Penafiel, A., Jakobsen, I., Bago, A., y Azcon-Aguilar, C. 2005. Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 168: 179-188.
- Gehring, C. A. y Whitham, T. G. 1994. Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. *Tree* 9: 251-255.
- Gerdemann, J. W. y Nicolson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycology Society* 46: 235-244.
- González-Trujano, M. E., Navarrete, A., Reyes, B., Cedillo, P. E., y Hong, E. 2001. Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Plant Medic* 67:136-141.
- INEGI. 2006. Información geográfica. Integración Territorial del XII Censo General Población y Vivienda 2000, estado 12 Guerrero. Municipio Tlapehuala. (<http://mapserver.inegi.gob.mx>).
- Lipman, J. G. 1903. Experiments on the transformation and fixation of nitrogen by bacteria , p. 217-285. *In*: 16th Annual Report over 1903 of the New Jersey State Agricultural Experiment Station, USA.

- Lovelock, C. E., Andersen, K., y Morton, J. B. 2003. Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forest are affected by host tree species and environment. *Oecología* 2: 268-279.
- López-Rubalcava, C., Pina-Medina, B., Estrada-Reyes, R., Heinze, G. y Martínez-Vázquez, M. 2006. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolla* in two anxiety paradigms: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Sciences* 78:730-737.
- Mark, A. W., Charles, A. y Rice, W. 2007. Seven years of enhanced water availability influences the physiological, structural, and functional attributes of a soil microbial community. *Applied Soil Ecology* 35: 535–545.
- McGonigle, T., Miller, M. H., Evans, D. L. G., Fairchild, G. L. y Swan, J. A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501.
- Mikola, J., Mervi N., Katja, I. y Mauritz V. 2005. Belowground responses by AM fungi and animal trophic groups to repeated defoliation in an experimental grassland community. *Soil Biology & Biochemistry* 37:1630–1639.
- Mohammad, M., Pan, W. y Kennedy, A. 1998. Seasonal mycorrhiza colonization of winter wheat and its effect on wheat growth under field conditions. *Mycorrhiza* 8:139-144.
- Monz, C. A., Hunt, H. W., Reeves, F. B. y Elliot, E. T. 1994. The response of mycorrhizal colonization to elevated CO<sub>2</sub> and climate change in *Pascopyrum smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Plant and Soil* 165: 75-80.
- Morton, J. 1987. Ilama. p. 83-85. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL.
- Nascimento de Oliveira, A. y Antonio de Oliveira, L. 2005. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in plants of *Theobroma grandiflorum* Schum and *Paullinia cupana* Mart. Of an Agroforest System in Central Amazonia, Amazonas state, Brazil.
- Ochse, J. J., Soule, Jr. M. J., Dijkman, M. J. y Wehlborg, C. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. vol. 2. Trad. Del inglés por Blacklller Valdez Alonso. Ed. Continental S.A. Méx. 771 p.
- Olsen, S.R., Cole, C. V., Wantable, F. S. y Dean, L. A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circular 939. US Department of Agriculture. Washington, DC.

- Peréz-Moreno, J. y Ferrera-Cerrato, R. 1997. Mycorrhizal interactions with plants and soil organism in sustainable agroecosystems. pp. 91-112. *In*: Lewis publishers (Ed.). Soil Ecology in Sustainable Agricultura Systems. ed. Bussaard, L. y Ferrera-Cerrato, 168 p.
- Phillips, J. M., y Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycology Society* 55: 158-161.
- Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologyva* 17: 362-370.
- Pinto, A. C. de Q., Cordeiro, M. C. R., Andrade, S. R. M., Ferreira, F. R., Filgueiras, H. A., Alves, R. E. y Kimpara, D. I. 2005. *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK.
- Ramos-Zapata, J. A., Orellana, R. y Allen, E. B. 2006. Mycorrhizal dynamics and dependence of *Desmoncus orthacanthos* martius (Arecaceae), a native palm of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Intercencia* 5: 364-370.
- Rennie, R. J. 1980. N- isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. *Can. J. Bot.* 58: 21-24.
- Salvador. 1999. El cultivo de *Annona*. Guía Salvadoreña. 8 p.
- Saito, K., Suyama, T., Sato, S., y Sugawara, K. 2004. Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza* 14: 363-373.
- SAS Intitute. 1999. SAS User's Guide, ver 8.0. SAS Institute Inc., Cary, NC. 595 p.
- Smith, S. y Read, D. A. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. San Diego. CA. USA. 605.
- Suyama, K., H. Yamamoto, T. Naganawa, T. Iwata y H. Komada. 1993. A plate count method for aeróbic cellulose decomposers in soil by congo red staining. *Soil Sci. Plant Nutr.* 39: 361-365.
- Trent, J. D. Wallace, L. L., Svejcar, T. J. y Christiansen, S. 1988. Effect of grazing on growth, carbohydrate pools, and mycorrhizae in winter wheat. *Can. J. plant Sci.* 68:115-120.

## Capítulo 5

### DINÁMICA POBLACIONAL MICROBIANA EN LA FILÓSFERA DE ILAMA (*Annona diversifolia* Saff.) EN HUERTO NATURAL DEL TRÓPICO SECO EN GUERRERO

Jazmín Cortés Sarabia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

#### Resumen

La ilama es una planta caducifolia tropical, de la familia de las Anonáceas, que se encuentra distribuida en México, Centro y Sudamérica. Se estudiaron las poblaciones microbianas en plantas de ilama de tres edades; a) 1-8 meses, juveniles, b) 1-3 años, de edad mediana, c) 4-20 años, adultas, durante tres épocas del año cuando existían hojas (agosto, octubre y enero). Para evaluar la dinámica poblacional microbiana en la filósfera de ilama, se muestrearon hojas de plantas juveniles, medianas y adultas en campo. Para brácteas se muestrearon plantas adultas y medianas. Se evaluaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos y bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes a los grupos de *Azospirillum*, *Beijerenckia* y *Derxia*, mediante conteo en placa. Se utilizaron medios de cultivo específicos para cada grupo microbiano. Sería importante aclarar que dichos medios no son 100% selectivos, las mayores poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno encontradas en hojas de ilama fueron colonias con las características de los géneros de *Azospirillum*, *Beijerenckia* y *Derxia*. Estas se encontraron en las épocas de mayor precipitación (agosto y octubre), en hojas de plantas de ilama para todas las edades. Las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> en brácteas presentaron la misma tendencia que en hojas (mayor presencia en época de lluvia). En el caso de los hongos, las mayores poblaciones se presentaron en los meses con precipitación (agosto y octubre) comparados con los meses sin precipitación (enero). Las levaduras se encontraron en mayor cantidad en los meses con precipitación (agosto y octubre), lo cual demuestra que la humedad es importante para su desarrollo. Los resultados encontrados sugieren que las mayores poblaciones, independientemente de la edad de la planta de ilama, se encuentran en los meses de mayor precipitación.

**Palabras claves:** filósfera, fenología, *Annona diversifolia* Saff., hongos, levaduras, bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y dinámica microbiana.

MICROBIAL POPULATION DYNAMICS IN THE PHYLOPLANE OF ILAMA (*Annona diversifolia* Saff.) GARDEN IN A NATURAL DRY TROPICAL AREA IN GUERRERO

Jazmín Cortes Sarabia, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2008

**Abstract**

The ilama is a deciduous tropical plant in the family Annonaceae, which is distributed in Central and South America. We studied microbial populations in plants ilama of three ages; a) 1-8 months termed, young b) 1-3 years old termed, middle-aged, c) 4-20 years termed adults over three seasons when there were leaves (August, October and January). To assess the microbial population dynamics in the phyllosphere of ilama, were sampled in the field leaves of young, medium and adult plants. Were sampled in the field. For bracts only adult and medium plants were sampled. We evaluated the colony forming units (CFU) of fungi and nitrogen-fixing bacteria belonging to the groups of *Azospirillum*, *Beijerenckia* and *Derxia* by plate counting. We used culture media for each specific microbial group. The largest populations of nitrogen-fixing bacteria found in leaves ilama were *Azospirillum*, *Beijerenckia* and *Derxia*. These were found at the times of greatest precipitation (August-October) in the leaves of plants ilama for all ages. N<sub>2</sub>-fixing bacteria in bracts showed the same trend shown in leaves (greater presence in rainy season). In the case of fungi, the largest populations were presented with precipitation in the months (August-October). The yeasts were found in greater numbers in the months with precipitation (August-October), which shows the humidity is important for their development. The results suggest that the largest populations, regardless of the age of the plant ilama, are in the season of peak rainfall.

**Key words:** phyllosphere, phenology, *Annona diversifolia* Saff., fungi, yeasts, and N<sub>2</sub>-fixing bacteria microbial dynamics.

## 5.1. Introducción

La filósfera es un hábitat aéreo colonizada por microorganismos de los cuales se reportan en un promedio de  $10^6$  a  $10^7$  células/cm<sup>2</sup> (hasta  $10^8$  células/cm<sup>2</sup>) de hoja (Andrews y Harris, 2000; Hirano y Upper, 2000). Sobre las funciones ecológicas que desempeñan estos microorganismos en la superficie de las hojas no se conoce mucho, pero estudios recientes se han enfocado en conocer las interacciones que ocurren entre las bacterias en las hojas (Abanda-Nkpwatt *et al.*, 2006; Sandhu *et al.*, 2007). El área superficial de las hojas de las plantas es inmensa, cerca de  $6.4 \times 10^8$  km<sup>2</sup> y las comunidades microbianas grandes. Algunas especies microbianas se pueden aislar dentro de tejidos finos de las plantas (Andrews y Harris, 2000; Hirano y Upper, 2000).

Las comunidades microbianas en las hojas son diversas y éstas incluyen diferentes géneros de bacterias, hongos filamentosos, levaduras, algas y poco frecuentemente protozoarios y nematodos (Espinosa-Urgel, 2004; Madhaiyan *et al.*, 2007). Estudios recientes han documentado que una función de los hongos en la filósfera ésta vinculada con descomponer los componentes estructurales ricos en lignina, así como de celulosa. Asimismo, están involucrados en la dinámica de nutrientes, acumulación y descomposición de la materia orgánica en el suelo (Osono, 2006). Los azúcares residuales en las hojas colonizadas pueden no ser físicamente accesibles a las bacterias, debido a las limitaciones de humedad o la difusión de alimentos a través de la superficie de la hoja (Mercier y Lindow, 2000). Algunos trabajos sugieren que la mayoría del área de las hojas abriga cantidades pequeñas de alimento y éstas pueden ser abundantes en algunas zonas como tricomas o sitios glandulares lesionados, en los cuales se encuentran las bacterias (Yadav *et al.*, 2004; Krimm *et al.*, 2005). Así, la mayoría de los inmigrantes a las hojas pueden encontrarse un ambiente oligotrópico, con crecimiento y actividad metabólica limitado, mientras que algunas células encuentran un “oasis” de alimento relativamente abundante. Por otro lado, estudios recientes indican que dentro de los agregados, las bacterianas pueden tener la capacidad de modificar su microambiente en la superficie de la planta, accionando la expresión de rasgos por microorganismos vecinos para beneficiar sus propias aptitudes en las plantas (Lindow y Brandl, 2003). Jacques *et al.* (2005) encontraron que al suprimir la tensión hídrica, las poblaciones bacterianas aumentaban. Jacobs *et al.* (2005) estudiaron el papel de la pigmentación de las hojas y el efecto que tienen las radiaciones ultravioleta en la supervivencia de las bacterias, y encontraron resultados que demuestran que algunas bacterias presentan sensibilidad

a la radiación ultravioleta (Jacobs y Sundin, 2001). De hecho, una característica de las bacterias epifitas es su capacidad para pigmentarse, ya que tal pigmentación les confiere protección contra la radiación ultravioleta (Fokkema y Schippers, 1986).

Estudios realizados en *Pseudomonas* han encontrado producción de biosurfactantes y siringomicina, que parece estar restringida a este género de bacterias (Brandl *et al.*, 2001). Schreiber *et al.* (2005) encontraron que las bacterias epifitas tienen la habilidad de permear el agua a través de las cutículas de *Hedera* y *Prunus* y que a la vez aumentan la disponibilidad de agua. McGrath y Andrews (2007) encontraron que las densidades de poblaciones bacterianas fueron altas en las venaciones de las hojas y sugieren que las sustancias promotoras de crecimiento ocurren localmente en las áreas venales. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la dinámica poblacional microbiana en la filósfera de ilama (hojas y brácteas) como respuesta a la estacionalidad y fenología de tres edades (1-8 meses denominadas juveniles, 1-3 años plantas de edad mediana y 4-20 años plantas adultas) durante tres épocas del año cuando existían hojas (agosto, octubre y enero).

## **5.2. Materiales y métodos**

### **5.2.1. Área de estudio**

El estudio se realizó en la localidad de San Antonio de las Huertas, Tlapehuala, estado de Guerrero. La localidad se ubica en la región de Tierra Caliente, en el noreste del estado, a 18°16' 39'' latitud norte y 100°31'03' longitud oeste, a una altitud de 250 a 360 m. El clima es cálido subhúmedo, con temperaturas mínimas y máximas de 25 y 30 °C y 36 y 40 °C en los meses de diciembre y mayo, respectivamente (INEGI, 2006).

### **5.2.2. Muestreo en campo**

Para la evaluación de la dinámica de las poblaciones microbianas en filósfera se muestrearon hojas y brácteas de ilama (*Annona diversifolia* Saff.), dado que la presencia de estas últimas es la característica que define a la especie. Las hojas usualmente fueron obovadas y pecioladas y las brácteas en la base de las hojas fueron visualmente semiredondeadas y no pecioladas. Las hojas se muestrearon de plantas de tres edades en distintos estadios fenológicos (1-8 meses, juveniles; 1-3 años, de edad mediana; 4-20 años, adultas) durante tres épocas del año cuando existían hojas

agosto, octubre y enero. Esta planta carece de hojas durante los meses de febrero a junio. El tejido foliar muestreado de las brácteas, provino solamente de dos estadios fenológicos de plantas (medianas y adultas); dichas estructuras sólo se encontraron en estos estadios.

### **5.2.3. Evaluación de microorganismos filosféricos (hojas)**

Para el caso de las muestras vegetales de hojas se evaluaron tres edades (juveniles, medianos y adultos) en tres épocas del año. De cada edad se tuvieron tres repeticiones, y de cada época del año tres repeticiones. La evaluación de las poblaciones microbianas, se realizó con la siguiente metodología: se cortaron hojas de ilama en cuadrículas de 1 cm<sup>2</sup> para las preparaciones de las diluciones. Dichas hojas, se cortaron de tal manera que se tomaron fragmentos de áreas representativas de la lámina (ápice, parte de la base de la hoja, centro, y bordes). Se esterilizaron 10 mL de agua destilada en tubos de dilución, y a cada tubo se le aplicaron 10 fragmentos de hojas de 1 cm<sup>2</sup>. Posteriormente, a dichos tubos se les aplicó 1 mL de tween 20 al 1%. Se agitaron durante 10 min.

Se evaluaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos, mediante conteo en placa en papa dextrosa agar, siguiendo los métodos rutinarios de microbiología de suelos (Ferrera-Cerrato y González-Chávez, 1993). Con el mismo método, se evaluaron las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno con características de los géneros de *Azospirillum*, *Beijerenckia* y *Derxia*, en los medios de cultivo, NFb, LG para *Beijerenckia* y LG para *Derxia* (Lipman, 1903). Las evaluaciones, se efectuaron entre 3 y 8 días después de la siembra. Para cada edad, en cada época del año se sembraron tres diluciones con tres repeticiones para cada uno de los medios de cultivo. Las placas se incubaron a 28 °C, para la evaluación de microorganismos en brácteas de ilama. Se utilizó la metodología antes mencionada, y se evaluaron los mismos grupos microbianos. Para este tejido vegetal solo se evaluarán las poblaciones microbianas de dos edades (medianas y adultas) en tres épocas del año, debido a que los estadios juveniles no presentan estas estructuras.

### **5.2.4. Análisis estadístico**

Los datos que se obtuvieron en las diferentes variables evaluadas, se les realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Los valores de UFC se

transformaron a logaritmos previos a los análisis de varianza respectivos. Los datos se analizaron con el paquete estadístico SAS 6.03 (SAS Institute, 1999).

### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Dinámica microbiana y estacionalidad

En hojas obovadas las mayores poblaciones afines a los géneros *Beijerenckia* y *Derxia* en plantas de 1 a 8 meses, se presentaron en el mes de octubre (presencia de precipitación), dichas poblaciones de *Beijerenckia* se encontraron en promedios de  $254.33 \times 10^4$  y *Derxia* en  $338.33 \times 10^4$  (Cuadro 5.1). Las poblaciones de hongos en plantas de 1 a 8 meses y de 1 a 3 años se mantuvieron durante las tres épocas evaluadas agosto (presencia de precipitación), octubre (presencia de precipitación) y enero (ausencia de precipitación). Para el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre como *Beijerenckia* y *Derxia*, se encontraron, mayores poblaciones durante agosto y octubre para todas las edades (Cuadro 5.1). Se observó menor población de microorganismos para todas las edades en el mes de enero (ausencia de precipitación), ocasionado probablemente por la ausencia de precipitación y por la senescencia de las hojas. Las mayores poblaciones afines a los géneros de *Beijerenckia*, *Derxia* y *Azospirillum* en brácteas se encontraron en los meses de agosto (presencia de precipitación) y octubre (presencia de precipitación) en plantas de 4-20 años (Cuadro 5.2). En el caso de los hongos las mayores poblaciones se encontraron en plantas de 4-20 años, durante los periodos de octubre y agosto, con poblaciones que oscilaban entre  $30.60 \times 10^3$  (agosto) y  $52 \times 10^3$  (octubre) (Cuadro 5.2). Las levaduras solo se encontraron en agosto y octubre en plantas de 1 a 3 años ( $3.6 \times 10^3$  UFC cm<sup>2</sup>). Las menores poblaciones microbianas se localizaron en el mes de enero, esta tendencia se observó en todas las edades evaluadas (Cuadro 5.2).

**Cuadro 5.1.** Poblaciones de microorganismos de filósfera de hojas obovadas y pecioladas de plantas de “ilama” (*Annona diversifolia* Saff.) de tres edades en tres estadios fenológicos.

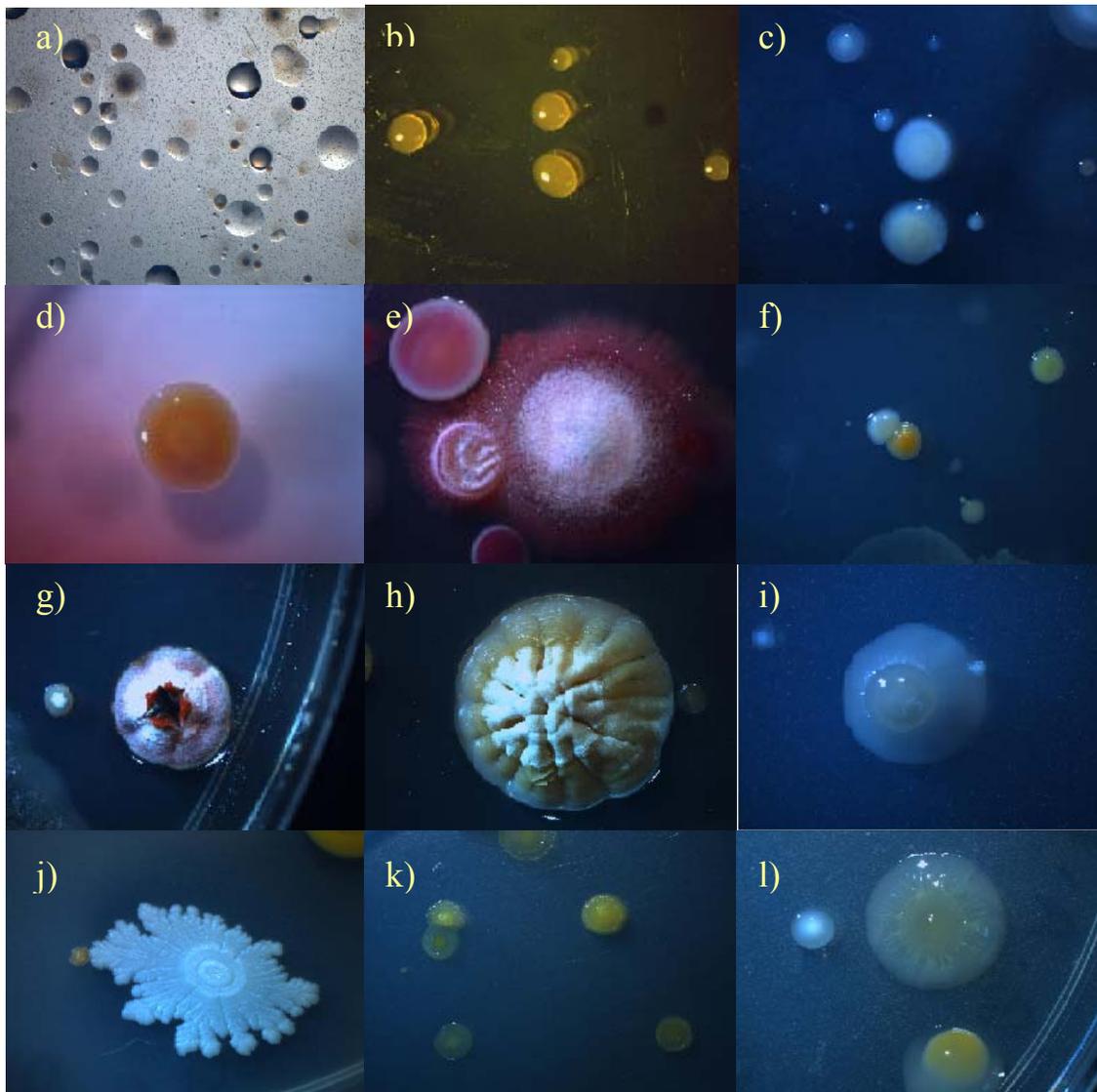
Edades y medios de cultivo sólidos	Estadio fenológico de las plantas ¶		
	I	II	III
	————— Unidades formadoras de colonias por cm <sup>2</sup> —————		
Plantas de 1 a 8 meses			
LG ( <i>Beijerenckia</i> spp.)	307.3 x 10 <sup>3</sup> b	254.33 x 10 <sup>4</sup> a	1.66 x 10 <sup>2</sup> c
LG ( <i>Derxia</i> spp.)	233 x 10 <sup>3</sup> b	338.33 x 10 <sup>4</sup> a	2.33 x 10 <sup>2</sup> c
Malato mas rojo congo ( <i>Azospirillum</i> spp.)	0.31 x 10 <sup>2</sup>	0	
PDA			
Hongos totales	10.60 x 10 <sup>2</sup> a	12 x 10 <sup>2</sup> a	0.33 x 10 <sup>3</sup> a
Levaduras	19.00 x 10 <sup>2</sup> b	26.6 x 10 <sup>2</sup> a	0
Plantas de 1 a 3 años			
LG ( <i>Beijerenckia</i> spp.)	180.6 x 10 <sup>3</sup> a	263.3 x 10 <sup>3</sup> a	2 x 10 <sup>3</sup> b
LG ( <i>Derxia</i> spp.)	243 x 10 <sup>3</sup> a	241.3 x 10 <sup>3</sup> a	0.66 x 10 <sup>3</sup> b
Malato mas rojo congo ( <i>Azospirillum</i> spp.)	1.3 x 10 <sup>3</sup>	0	0
PDA			
Hongos totales	69.60 x 10 <sup>2</sup> a	28.30 x 10 <sup>2</sup> a	38.66 x 10 <sup>2</sup> a
Levaduras	0	11.66 x 10 <sup>2</sup> a	0
Plantas de 4 a 20 años			
LG ( <i>Beijerenckia</i> spp.)	331.3 x 10 <sup>3</sup> a	141.3 x 10 <sup>3</sup> b	23.33 x 10 <sup>1</sup> c
LG ( <i>Derxia</i> spp.)	80 x 10 <sup>3</sup> ab	266 x 10 <sup>3</sup> a	16.33 x 10 <sup>3</sup> b
Malato mas rojo congo ( <i>Azospirillum</i> spp.)	9.2 x 10 <sup>2</sup>	0.020 x 10 <sup>2</sup>	0
PDA			
Hongos totales	50.60 x 10 <sup>3</sup> a	13.66 x 10 <sup>3</sup> b	14.33 x 10 <sup>4</sup> a
Levaduras	0	1.66 x 10 <sup>2</sup> a	0

I: llenado de fruto (mes de agosto); II: presencia de frutos maduros (mes de octubre); III: inicio de defoliación (mes de enero). ¶ Medio LG (Lipman, 1903): medio para *Beijerenckia* spp. y *Derxia* spp., utilizado para evaluar bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre; medio de malato más rojo congo (Paredes, 1988) utilizado para evaluar *Azospirillum* spp.; PDA: papa dextrosa agar con rosa de bengala (Beever y Bollard, 1970) utilizado para evaluar hongos totales. Valores en la misma fila con la misma letra no son diferentes según Tukey (p=0.05). n=3. Rango del NMP con 95% de confianza (Alexander, 1982). Cabe mencionar que los medios utilizados para evaluar las poblaciones bacterianas fijadoras de nitrógeno, no son 100% selectivos, por lo tanto las poblaciones evaluadas son afines a los géneros citados.

**Cuadro 5.2.** Poblaciones de microorganismos de filósfera de hojas semiredondeadas no pecioladas de plantas de “ilama” (*Annona diversifolia* Saff.) de dos edades en tres estadios fenológicos.

Edades y medios de cultivo sólido	Estadio fenológico de las plantas		
	I ¶	II	III
	————— Unidades formadoras de colonias por cm <sup>2</sup> —————		
Plantas de 1 a 3 años			
LG ( <i>Derxia</i> spp.) ¶¶	194 x 10 <sup>4</sup> a	443.66 x 10 <sup>4</sup> a	2.0 x 10 <sup>3</sup> b
LG ( <i>Beijerenckia</i> spp.)	414 x 10 <sup>3</sup> b	531.3 x 10 <sup>3</sup> b	120.0 x 10 <sup>4</sup> a
Malato más rojo congo ( <i>Azospirillum</i> spp.) PDA	0.23 x 10 <sup>2</sup>	0	0
Hongos totales	4.33 x 10 <sup>3</sup> a	11.00 x 10 <sup>2</sup> a	44 x 10 <sup>2</sup> a
Levaduras	3.6 x 10 <sup>3</sup> a	3.6 x 10 <sup>3</sup> a	0
Plantas de 4 a 20 años			
LG ( <i>Derxia</i> spp.)	212 x 10 <sup>3</sup> b	376.66 x 10 <sup>4</sup> a	0
LG ( <i>Beijerenckia</i> spp.)	399 x 10 <sup>3</sup> a	22.33 x 10 <sup>3</sup> b	0
Malato más rojo congo ( <i>Azospirillum</i> spp.) PDA	3.5 x 10 <sup>2</sup>	0.020 x 10 <sup>2</sup>	0
Hongos totales	30.60 x 10 <sup>3</sup> a	52.00 x 10 <sup>3</sup> a	0.66 x 10 <sup>2</sup> b
Levaduras	0	0	0

I: llenado de fruto (mes de agosto); II: presencia de frutos maduros (mes de octubre); III: inicio de defoliación (mes de enero).¶ medio LG (Lipman, 1903): medio para *Beijerenckia* spp. y *Derxia* spp., bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre; medio malato más rojo congo (Paredes, 1988): medio para *Azospirillum* spp.; PDA: papa dextrosa agar con rosa de bengala (Beever y Bollard, 1970) utilizado para evaluar hongos totales. Valores en la misma fila con la misma letra no son diferentes según Tukey (p=0.05). n=3. Rango del NMP con 95% de confianza (Alexander, 1982). Cabe mencionar que los medios utilizados para evaluar las poblaciones bacterianas fijadoras de nitrógeno, no son 100% selectivos, por lo tanto las poblaciones evaluadas son afines a los géneros citados.



**Figura 5.1.** Microorganismos filamentosos (a-d) y rizosféricos (e-l) de plantas de ilama: a) bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas de 4 a 20 años; b) bacterias afines a *Azotobacter* sp. en plantas de 1 a 3 años; c) bacterias afines a *Derxia* sp.; d) bacteria afín a *Derxia* sp.; e) hongos en plantas de 4 a 20 años; f) bacterias afines a *Derxia* sp. en plantas de 4 a 20 años; g) actinomiceto en plantas de 1 a 3 meses; h) actinomiceto en plantas de 1 a 3 años; i) bacteria afín a *Azotobacter* sp. en plantas de 4 a 20 años; j) bacteria solubilizadora de fosfato en plantas de 1 a 3 años; k) bacterias afines a *Beijerenckia* sp. en plantas de 1 a 3 meses; l) bacterias afines a *Beijerenckia* sp. en plantas de 4 a 20 años.

### 5.3.2. Dinámica microbiana y fenología

Para el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno las mayores poblaciones de *Beijerenckia* se encontraron en las hojas obovadas de plantas de 1 a 8 meses ( $254.33 \times 10^4$ ) en el mes de octubre (Anexo 9). Las poblaciones de *Derxia* y *Beijerenckia* no variaron en las tres edades evaluadas para el mes de agosto (llenado de fruto), los promedios oscilaron entre  $80-243 \times 10^3$  UFC  $\text{cm}^2$ , para *Derxia*, y para *Beijerenckia*  $180.6-331 \times 10^3$  UFC  $\text{cm}^2$ . Las poblaciones de *Azospirillum* únicamente se encontraron en el primer estadio (agosto) para todas las edades, lo cual indica decremento de las poblaciones, esto probablemente ocasionado por la falta de humedad. Las bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  como *Azospirillum*, *Beijerenckia* y *Derxia* no variaron para el mes de agosto en las diferentes edades de plantas de ilama (Cuadro 5.1). Las mayores poblaciones de hongos, *Beijerenckia*, *Derxia*, *Azospirillum* y levaduras se encontraron en plantas de 4 a 20 años en el mes de agosto (presencia de precipitación). Las mayores poblaciones de *Beijerenckia* fueron de  $254.33 \times 10^4$  y *Derxia* de  $338.33 \times 10^4$  estas se encontraron en el mes de octubre en plantas de 1 a 8 meses. Cabe mencionar que las levaduras solo se encontraron en el mes de octubre (presencia de frutos maduros), en todas las edades de las plantas de ilama en cantidades que oscilaban de  $1.66 \times 10^2$  a  $26.6 \times 10^2$  UFC  $\text{cm}^2$  (Cuadro 5.2). Las poblaciones de *Derxia*, *Beijerenckia* y hongos no variaron en las brácteas de plantas de 1 a 3 años y en plantas de 4-20 años en el mes de agosto (llenado de fruto). Cabe mencionar, que para el mes de enero (inicio de defoliación) no se observó presencia de bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  para plantas de 1 a 3 años y de 4-20 años. La mayor cantidad de microorganismos se encontró en plantas de 1 a 3 años en el mes de agosto (Cuadro 5.2).

### 5.4. Discusión

La superficie de las hojas se ha considerado un ambiente hostil para los colonos bacterianos, debido a que la superficie de las hojas se expone a temperaturas que fluctúan rápidamente y a la humedad relativa. Las hojas proporcionan nutrientes limitados a los colonos bacterianos, mientras que otros habitats ofrecen probablemente condiciones más extremas como la desecación o exposición a altas temperaturas. Diversos factores pueden influenciar el microhabitat colonizado por las bacterias en las hojas. Primero, la hoja está rodeada por una capa laminar muy fina, en la cual la humedad es emitida a través de los estomas, de tal modo que alivia la tensión del agua, a la cual se exponen los epifitos. En segundo lugar, algunas células en

una población bacteriana de la hoja, particularmente en poblaciones planta-patógenos, puede no residir en sitios expuestos en la superficie de la hoja, sino que por el contrario pueden por lo menos localmente invadir el interior de la hoja, evitando las tensiones en el exterior y residiendo en los compartimientos substomatal u otras localizaciones interiores (Mercier y Lindow, 2000; Wilson *et al.*, 1999).

#### **5.4.1. Dinámica microbiana en hojas obovadas y pecioladas como respuesta a la estacionalidad**

Las mayores poblaciones de *Beijerenckia* y *Derxia* se presentaron en el mes de octubre (presencia de precipitación), en plantas de 1 a 8 meses. Las poblaciones de *Beijerenckia* se encontraron en promedio de  $254.33 \times 10^4$  y *Derxia* en  $338.33 \times 10^4$ , lo cual sugiere, que las bacterias fijadoras de nitrógeno se encontraron en mayor número poblacional, cuando hubo humedad, en plantas de 1 a 8 meses, esto probablemente debido a que en esta etapa de crecimiento las plantas necesitan altos contenidos de nitrógeno. Jackson *et al.* (2006) estudiaron los cambios que ocurren en las comunidades bacterianas de la filósfera en helechos rehidratados. Dichos autores encontraron de manera similar a lo encontrado en el presente trabajo, que el número de bacterias, aumentaron con la presencia de lluvia.

En el caso de las poblaciones de hongos se observó que la humedad afectó el desarrollo de dichos organismos en el caso de plantas de ilama de 4 a 20 años. De manera similar Blodgett *et al.* (2007) estudiaron la incidencia de hongos endófitos en hojas y raíces de híbridos de *Amaranthus* en Potchefstroom, África del Sur. Encontraron que la recuperación más alta de hongos en las hojas de *Amaranthus* se presentó en el año más húmedo, en contraste con los hongos rizosféricos en donde su recuperación era más alta en el año más seco para todos los tratamientos. En nuestro caso no se identificó la diversidad de hongos encontrados, pero en base a su conspicua variación macromorfológica se puede inferir que la comunidad fúngica presente era muy diversa. Osono (2006) realizó una revisión de los hongos filósfericos y sus funciones en tales nichos, y encontró que un total de 41 géneros de hongos de la filósfera se han reportado en hojas en árboles de 19 géneros. Asimismo, encontró que los hongos de la filósfera tienen la habilidad de utilizar varios compuestos orgánicos como fuente de carbono, ya que poseen la habilidad de descomponer compuestos orgánicos ricos en lignina.

Para el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre como *Beijerenckia* y *Derxia* se encontraron las mayores poblaciones durante agosto y octubre (presencia de precipitación), para todas las edades. Se observó que las menores poblaciones de microorganismos evaluados, se presentaron en el mes de enero, esto probablemente ocasionado por la ausencia de precipitación y por la senescencia de las hojas. Yadav *et al.* (2005) encontraron que el sistema hoja-microorganismos puede ser descrito eficazmente a través de tres atributos de la hoja. Las hojas con volumen de agua >73% son favorablemente colonizadas, así también las hojas con más cantidad de fósforo (>1.34 mg g<sup>-1</sup>) se colonizan más. Estos autores encontraron que las hojas con epidermis más espesa de 20.77 mm son menos colonizadas. Gunasekera y Paul (2007); Iriarte *et al.* (2007) estudiaron los efectos de los rayos ultravioleta en la filósfera de plantas tropicales y encontraron que el papel de estos en la microbiología de la superficie de las hojas de plantas, disminuye las densidades poblacionales de *Xanthomonas* sp., y otros bacteriófagos, aunado a los factores climáticos.

De Costa *et al.* (2006) estudiaron las poblaciones microbianas en la filósfera de 15 variedades de arroz con hojas de caracteres anatómicos y fisiológicos los cuales, determinan la densidad y diversidad microbiana filósferica, en dos estaciones consecutivas para cuantificar las poblaciones bacterianas y fúngicas bajo vivero y campo. En este estudio, concluyeron que los caracteres anatómicos y fisiológicos están correlacionados negativamente con la temperatura de la hoja, siendo otro factor importante y lo cual, sugiere que esto se debe a los micrositios favorables de la filósfera con respecto al crecimiento microbiano.

#### **5.4.2. Dinámica microbiana en brácteas como respuesta a la estacionalidad**

Las poblaciones de *Derxia*, *Beijerenckia* y *Azospirillum* se encontraron en mayor cantidad en los meses de agosto y octubre (presencia de precipitación) en plantas de 4-20 años, esto debido a que en este período particularmente, en el mes de agosto mes en el cual existe mayor demanda nutrimental por la formación de follaje y llenado del fruto. Los hongos encontrados en plantas de 4-20 años en los períodos de agosto y octubre fueron los más altos en poblaciones que oscilaban de 30.60x10<sup>3</sup> (agosto) y 52x10<sup>3</sup> (octubre). Rivas *et al.* (2007) estudiaron la caracterización de bacterias xilanólíticas aisladas de la filósfera en brácteas de palma. Encontraron, que las poblaciones bacterianas en los ecosistemas filósfericos son complejas, y sugieren que las

bacterias involucradas en la degradación de la planta están presentes en la degradación temprana de brácteas de los árboles de palma seca. Para el caso de las levaduras solo se encontraron en los meses de agosto y octubre en plantas de 1 a 3 años ( $3.6 \times 10^3$  UFC  $\text{cm}^2$ ). Sampaio *et al.* (2007) estudiaron la dinámica poblacional de levaduras en hojas, a lo largo de la descomposición y encontraron 62 taxas de levaduras en los diferentes tipos de desechos orgánicos, estos autores concluyeron que todos los tipos de desechos orgánicos tienen especies de levaduras como *Cryptococcus hansenii*, *Debaryomyces* y *Rhodotorula glutinis* entre las 20 especies de levaduras más comunes. Las menores poblaciones microbianas se localizaron en el mes de enero, esta tendencia se observó en todas las edades evaluadas (1 a 3 años y 4 a 20 años). Probablemente, originado por la senescencia de las hojas y la nula precipitación, dado que la capa cerosa, tiene diversas estructuras cristalinas tridimensionales en diversas especies de plantas y puede cambiar cuando las hojas envejecen, probablemente por las modificaciones microbianas a la difusión pasiva de los límites de alimentos y el vapor de agua del interior de la planta sobre la superficie (Knoll y Schreiber, 1998; Knoll y Shreiber, 2000). Asimismo, la disponibilidad de alimentos carbonados que contienen las hojas es determinante para la colonización epifita (Wilson y Lindow, 1994). Los azúcares simples tales como glucosa, fructosa, y sucrosa son las fuentes dominantes de carbón en las plantas que se han examinado (Mercier y Lindow, 2000).

#### **5.4.3. Dinámica microbiana en hojas y brácteas y fenología**

Para el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno las mayores poblaciones de *Beijerenckia* se encontraron en las hojas de plantas de 1 a 8 meses ( $254.33 \times 10^4$ ) en el mes de octubre. Las poblaciones de *Derxia* y *Beijerenckia* no variaron por edad para el mes de agosto, los promedios fueron de  $80-243 \times 10^3$  UFC  $\text{cm}^2$ , para *Derxia*, y para *Beijerenckia*  $180.6-331 \times 10^3$  UFC  $\text{cm}^2$ . Las poblaciones de *Azospirillum* solo se encontraron en agosto (llenado de fruto), por lo cual estos grupos bacterianos fijadores de nitrógeno posiblemente cumplen un papel importante en la traslocación de nitrógeno, en estos estadios de demanda nutrimental por la planta, lo cual puede explicar su abundancia. Las mayores poblaciones de hongos, *Beijerenckia*, *Derxia*, *Azospirillum* y levaduras se encontraron en plantas de 4 a 20 años en el mes de agosto (llenado de fruto), esto probablemente este relacionado con la demanda nutrimental en este estadio de la planta. Las mayores poblaciones de *Beijerenckia* ( $254.33 \times 10^4$ ) y *Derxia* ( $338.33 \times 10^4$ ) se encontraron en octubre, en plantas de 1 a 8 meses. Las levaduras solo se encontraron en octubre (presencia de

frutos maduros) en cantidades que oscilaban de  $1.66 \times 10^2$  a  $26.6 \times 10^2$  UFC cm<sup>2</sup>. Glushakova *et al.* (2007) encontraron, que el número de levaduras Asqueosporogenas del género *Saccharomyces paradoxus* aumentaron considerablemente en periodos cortos (principio de verano y en invierno).

Las poblaciones de *Derxia* y *Beijerenckia* y hongos no variaron en las brácteas plantas evaluadas de 1 a 3 años y plantas de 4-20 años en el mes de agosto (llenado de fruto), siendo las mayores poblaciones en comparación con los meses de octubre y enero. Cabe mencionar que para el mes de enero no hubo presencia de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>, esto probablemente originado por la ausencia de humedad. Behrendt *et al.* (2004) estudiaron los efectos de la fertilización reducida, sobre la colonización microbiana en la filósfera de pastos, encontraron que la senescencia de las hojas en pasto influye significativamente en ciertos grupos microbianos. Las bacterias heterotróficas, aeróbicas y anaeróbicas, la formación de esporas, así como hongos filamentosos, mostraron un aumento en densidades de población en hierbas o pastos maduros en cortes posteriores. Las diferencias en la proporción de aplicación de fertilizante y la frecuencia de corte tuvieron un efecto en el rendimiento de materia seca, influyendo también en la densidad de población de bacterias heterotróficas, y en ciertas circunstancias en hongos filamentosos.

### 5.5. Conclusiones

Tanto en hojas como en brácteas las bacterias fijadoras de nitrógeno (*Beijerenckia*, *Derxia* y *Azospirillum*), tuvieron mayores poblaciones en los meses con precipitación (agosto y octubre) comparadas con el mes sin precipitación (enero).

Las levaduras se ven afectadas por el factor humedad, ya que la mayor cantidad se encontró en los meses con mayor precipitación (agosto y octubre).

La dinámica microbiana filosférica de las poblaciones microbianas evaluadas, está influenciada por la humedad en el ambiente. Encontrándose mayor cantidad de microorganismos en épocas donde la precipitación fue mayor y la temperatura menor.

## 5.6. Literatura citada

- Abanda-Nkpawatt, D., Krimm, U., Coiner, H. A., Schreiber, L. y Schwab, W. 2006. Plant volatiles can minimize the growth suppression of epiphytic bacteria by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* in co-culture experiments. *Environmental And Experimental Botany* 56: 108-119
- Alexander, M. 1982. Most probable number method for microbial populations. pp. 815- 820. In: Page, A. L.; Miller, R. H.; Keeney, D. R. 1982. *Methods of soil analysis*. Second Edition, Num. 9 (2 parte). Edit. American Society of Agronomy, Inc. 1159 p.
- Andrews, J. H., y R. F. Harris. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:145-180.
- Beever, R. y Bollard, E. 1970. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *J. Gen. Microbiol.* 60: 273-279.
- Behrendt, U., Stauber, T. y Muller, T. 2004. Microbial communities in the phyllosphere of grasses on fenland at different intensities of management. *Grass And Forage Science* 59: 169-179.
- Blodgett, J. T., Swart, W. J., Louw S. V. y Weeks W. J. 2007. Soil amendments and watering influence the incidence of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* in south Africa. *Applied Soil Ecology* 35: 311-318.
- Brandl, M. T., Quinones, B., y Lindow, S. E. 2001. Heterogeneous transcription of an indoleacetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola* on plant surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3454-3459.
- De Costa, D. M., Rathnayake, R. M. P. S., De Costa, W. A. J. M., Kumari, W. M. D. y Dissanayake, D. M. N. 2006. Variation of phyllosphere microflora of different rice varieties in Sri Lanka and its relationship to leaf anatomical and physiological characters. *Journal Of Agronomy And Crop Science* 192: 209-220.
- Espinosa-Urgel, M. 2004. Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. *Plasmid* 52: 139-150.
- Ferrera-Cerrato R., González-Chávez M. C. A. y Rodríguez-Mendoza M. N. 1993. *Manual de agromicrobiología*. Ed. Trillas, primera edición. México. Pp: 64-74.
- Fokkema, N. J., y Schippers, B. 1986. Phyllosphere vs rhizosphere as environments for saprophytic colonization. p. 137-159. In N. J. Fokkema and J. Van den Heuvel (ed.),

- Microbiology of the phyllosphere. Cambridge University Press, London, United Kingdom.
- Glushakova, A. M., Ivannikova, Y. V., Naumova, E. S., Chernov, I. Y. y Naumov, G. I. 2007. Massive isolation and identification of *Saccharomyces paradoxus* yeasts from plant Phyllosphere. *Microbiology* 76: 205-210.
- Gunasekera, T. S. y Paul, N. D. 2007. Ecological impact of solar ultraviolet-B (UV-B : 320-290 nm) radiation on *Corynebacterium aquaticum* and *Xanthomonas* sp. colonization on tea phyllosphere in relation to blister blight disease incidence in the field. *Letters In Applied Microbiology* 44: 513-519.
- Hirano, S. S., y Upper, C. D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:624-653.
- INEGI. 2006. Información geográfica. Integración Territorial del XII Censo General Población y Vivienda 2000, Estado 12 Guerrero. Municipio Tlapehuala. (<http://mapserver.inegi.gob.mx>).
- Jackson, E. F., Echlin, H. L. y Jackson, C. R. 2006. Changes in the phyllosphere community of the resurrection fern, *Polypodium polypodioides*, associated with rainfall and wetting. *Fems Microbiology Ecology* 58: 236-246.
- Jacques, M. A, Josi, K., Darrasse, A. y Samson, R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2008-2015.
- Jacobs, J. L., Carroll, T. L, Sundin, G. W. 2005. The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microbial Ecology* 49: 104-113.
- Jacobs, J. L. y Sundin, G. W. 2001. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5488-5496.
- Knoll, D., y Schreiber, L. 1998. Influence of epiphytic micro-organisms on leaf wettability: wetting of the upper leaf surface of *Juglans regia* and of model surfaces in relation to colonization by micro-organisms. *New Phytol.* 140:271-282.
- Knoll, D. y Schreiber, L. 2000. Plant-microbe interactions: wetting of ivy (*Hedera helix* L.) leaf surfaces in relation to colonization by epiphytic microorganisms. *Microb. Ecol.* 40:33-42.

- Krimm, U., Abanda-Nkpwatt, D., Schwab, W. y Schreiber, L. 2005. Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. *FEMS Microbiology Ecology* 53: 483-492.
- Lindow, S. E. y Brandl, M. T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1875-1883.
- Lipman, J. G. 1903. Experiments on the transformation and fixation of nitrogen by bacteria , p. 217–285. In: 16th Annual Report over 1903 of the New Jersey State Agricultural Experiment Station, USA.
- Madhaiyan, M., Kim, B. Y., Poonguzhali, S., Kwon, S. W., Song, M. H., Ryu, J. H., Go, S. J., Koo, B. S. y Sa, T. M. 2007. *Methylobacterium oryzae* sp nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-L-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology* 57: 326-331.
- McGrath, M. J. y Andrews, J. H. 2007. Role of microbial immigration in the colonization of apple leaves by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1277-1286.
- Mercier, J. y Lindow, S. E. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:369-374.
- Osono, T. 2006. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal Microbiology* 52: 701-716.
- Paredes-Cardona, E., Carcaño-Montiel, M., Mascarua-Esperanza, M.A. y Caballero-Mellano, J. 1988. Responses of maize to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 30: 351-355.
- Rivas, R., Garcia-Fraile, P., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E. y Velazquez, E. 2007. Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm *Phoenix dactylifera* *Letters in Applied Microbiology* 44: 181-187.
- Sandhu, A., Halverson, L. J. y Beattie, G. A. 2007. Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere. *Environmental Microbiology* 9: 383-392.
- SAS Intitute. 1999. SAS User's Guide, ver 8.0. SAS Institute Inc., Cary, NC. 595 p.

- Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G. y Kroppenstedt, R. M. 2005. Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist* 166: 589-594.
- Wilson, M., Hirano, S. S. y Lindow, S. E. 1999. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1435-1443.
- Wilson, M. y Lindow, S. E. 1994. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4468-4477.
- Yadav, R. K. P., Halley, J. M., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I. y Vokou, D. 2004. Bacterial populations on the leaves of Mediterranean plants: quantitative features and testing of distribution models. *Environmental and Experimental Botany* 52: 63-77.
- Yadav, R. K. P., Karamanoli, K. y Vokou, D. 2005. Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microbial Ecology* 50: 185-196.

## CONCLUSIONES FINALES Y CONSIDERACIONES GENERALES

En plantas de ilama evaluadas en campo se observó mayor colonización micorrízica total en plantas no defoliadas, cuando había menor temperatura y mayor precipitación (agosto), independientemente de la edad.

El mayor número de esporas en plantas de ilama en campo se encontró en los meses con menor temperatura (octubre y enero) independientemente de la edad.

La colonización micorrízica total en plantas de ilama establecidas en vivero fue mayor en plantas no defoliadas (con follaje) que en plantas sin defoliarse, presentándose diferencia significativa, independientemente la cepa de hongo.

La dinámica microbiana filosférica de ilama, se ve afectada por la humedad, provocando un descenso de las poblaciones con características de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>.

En las brácteas las bacterias con características de géneros como *Beijerenckia*, *Derrxia* y *Azospirillum*, presentaron la misma tendencia que en hojas, observándose mayor número poblacional en los meses con precipitación (agosto y octubre).

## ANEXOS

**Anexo 1.** Medio de cultivo fuente combinada de carbono (Rennie, 1980); para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Solución "A"	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
NaCl	0.1 g
Na <sub>2</sub> Fe EDTA	0.028 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25 g
Extracto de levadura	0.1 g
Manitol	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Lactato de sodio	0.5 mL
Agua destilada	900 mL
Agar	15.0 g
pH	6.8
Solución "B"	
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.06 g
Agua destilada	100 mL
Biotina	0.005 g
P-aminobenzoico	0.02 g
Actidiona	0.05 g
pH	7.0

Fuente: Rennie, R. J. 1980. N- isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. Can. J. Bot. 58: 21-24.

**Anexo 2.** Medio para bacterias solubilizadoras de fosfatos (Pikovskaya, 1948).

Medio Picovskaya (g L <sup>-1</sup> )	
Glucosa	10
Ca <sub>3</sub> P <sub>0</sub> <sub>2</sub>	5
Mn <sub>4</sub> SO <sub>2</sub>	0.5
KCl <sub>2</sub>	0.2
MgSO <sub>2</sub>	0.1
MnSO <sub>2</sub>	Trazas
FeSO <sub>2</sub>	Trazas
Extracto de levadura	0.5
Agar	15
Agua destilada	1000 mL
pH	7

Fuente: Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17: 362-370.

**Anexo 3.** Medio de malato más rojo congo sólido para *Azospirillum* spp. (Paredes *et al.*, 1988).

<b>Medio de malato más rojo congo (sólido) (g L<sup>-1</sup>)</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.02
NaCl	0.1
Extracto de levadura	0.5
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.015
Ácido málico	5.0
KOH	4.8
Rojo congo (1:400 etanol)	10.0 mL
Agar	20.0
Agua destilada	1000 mL
pH	7

Fuente: Paredes-Cardona, E., Carcaño-Montiel, M., Mascarua-Esperanza, M.A. y Caballero-Mellano, J. 1988. Responses of maize to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Rev. Latinoam. Microbiol. 30: 351-355.

**Anexo 4.** Medio agar papa glucosa más rosa de bengala para hongos totales (Beever y Bollard, 1970).

<b>Medio agar papa glucosa más rosa de bengala (g L<sup>-1</sup>)</b>	
Agar papa glucosa	39
Rosa de bengala 1%	3.3 mL
pH	5

Fuente: Beever, R. y Bollard, E. 1970. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. J. Gen. Microbiol. 60: 273-279.

**Anexo 5.** Medio NFB (Para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre) (Baldani *et al.*, 1986).

<b>Medio NFB (Para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre) (g L<sup>-1</sup>)</b>	
Ácido málico	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.02
Elementos trazas	2.0 mL
Azul de bromotimol	2.0 mL
Fe EDTA	4.0 mL
Sol. de vitaminas:	1.0 mL
Biotina	
Piridoxina	
KOH	4.0
Agar	10.0
Agua destilada	1000 mL
Se utiliza NaOH para pH	6.8

Fuente: Baldani, J.I., Baldani, V.L.D.n and Dobreiner., J. 1986. Caracterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. Int. J. Syst.Bacteriol.36:86-93.

**Anexo 6.** Medio LG (Lipman, 1903): *Beijerenckia*, *Derxia* y *Azotobacter*, para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

<b>Medio LG (g L<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Reactivos</b>	<b><i>Azotobacter</i></b>	<b><i>Derxia</i></b>	<b><i>Beijerenckia</i></b>
Sacarosa	20		
Almidón glucosa		20	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15		
CaCl <sub>2</sub>	0.01		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.01		
Azul de bromotimol (0.5% en etanol).	2 mL		
Ca CO <sub>3</sub>	1.0		
NaHCO <sub>3</sub>			0.01
Agar	15.0		
Agua destilada	1000 mL		
pH	7.2		

Fuente: Lipman, J. G. 1903. Experiments on the transformation and fixation of nitrogen by bacteria. p. 217–285. In: 16th Annual Report over 1903 of the New Jersey State Agricultural Experiment Station, USA.

**Anexo 7.** Efecto de la defoliación o herbívora en diferentes especies de plantas.

Cita	Especie de planta	Efecto de la defoliación o herbivoría	Tipo de micorriza	Condición del experimento
(1)	<i>Digitaria eriantha</i>	(+/-)	HMA	invernadero
	<i>Lolium perenne</i>	(+/-)	HMA	invernadero
	<i>Themeda triandra</i>	(+)	HMA	invernadero
(2)	<i>Pinus sylvestris</i> L.	(-)	HEM	Campo
(3)	<i>Pinus contorta</i>	(-)	HEM	Campo
	<i>Picea engelmannii</i>	(-)	HEM	Campo
(4)	<i>Plantago lanceolata</i>	(+)	HMA	Maceta
	<i>Senecio jacobaea</i>	(-)	HMA	Maceta
(5)	Árboles de bosque forestal	(+)	HEM	Campo
(6)	<i>Miscanthus sinensis</i>	(+)	HMA	Campo
	<i>Zoysia japonica</i>	(+/-)	HMA	Campo
(7)	Bosque de pinos	(-)	HEM	Campo
(8)	<i>Solidagovirgaurea</i>	(-)	HMA	Maceta
	<i>Gnaphalium norvegicum</i>	(-)	HMA	Maceta
(9)	<i>Trifolium repens</i>	(-)	HMA	Maceta
	<i>Phleum pratense</i>	(-)	HMA	Maceta
(10)	<i>Centáurea maculosa</i>	(-)	HMA	Maceta
	<i>Festuca idahoensis</i>	(+)	HMA	Maceta
	<i>Pseudoroegneria spicata</i>	(+/-)	HMA	Maceta

- (1) Allsopp, N. 1998. Effect of defoliation on the arbuscular mycorrhizas of three perennial pasture and rangeland grasses. *Plant and Soil* 202: 117-124.
- (2) Saikkonen, K. 1999. Defoliation and mycorrhizal symbiosis a functional balance between carbon sources and below-ground sinks. *Ecology Letters* 2: 19-26.
- (3) Cullings, K. W., Vogler, D. R. Parker, V. T., Makhija, S. 2001. Defoliation effects on the ectomycorrhizal community of a mixed *Pinus contorta/Picea engelmannii* stand in Yellowstone Park. *Oecologia* 127:533-539.
- (4) Gange, A.C., Bower, E. y Brown, V. K. 2002. Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonization. *Oecologia* 131:103-112.
- (5) Markkola, A., Kuikka, K., Rautio, E. H., Roitto, M., Tuomi, J. 2004. Defoliation increases carbon limitation in ectomycorrhizal symbiosis of *Betula pubescens*. *Oecologia* 140: 234-240.
- (6) Saito, K., Suyama, T., Sato, S., y Sugawara, K. 2004. Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza* 14: 363-373.
- (7) Cullings, K., Raleigh, C., New, H. M., y Henson, J. 2005. Effects of Artificial Defoliation of Pines on the Structure and Physiology of the Soil Fungal Community of a Mixed Pine-Spruce Forest. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1996-2000.
- (8) Pietikainen, A., Kytoviita, M. M. y Vuoti, U. 2005. Mycorrhiza and seedling establishment in a subarctic meadow: Effects of fertilization and defoliation. *Journal of vegetation science* 16:175-182.
- (9) Mikola, J., Mervi N., Katja, I. y Mauritz V. 2005. Belowground responses by AM fungi and animal trophic groups to repeated defoliation in an experimental grassland community. *Soil Biology & Biochemistry* 37:1630-1639.
- (10) Walling, S. Z., y Zabinski C. A. 2006. Defoliation effects on arbuscular mycorrhizae and plant growth of two native bunchgrasses and an invasive forb. *Applied Soil Ecology* 32: 111-117.

**Anexo 8.** Morfología macroscópica de colonias bacterianas encontradas en la filosfera y rizosfera de ilama (*Annona diversifolia* Saff.).

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
AZT-15	circular	entero	plana	butirosa	crema
FCC-19	circular	ondulado	papilar	membranosa	crema
FCC-25	circular	entero	umbonada	butirosa	crema
BEI-27	circular	ondulado	papilar	membranosa	crema
BEI-29	circular	entero	umbonada	butirosa	blanco
DER-1	puntiforme	entero	elevada	butirosa	crema
NFB-2	circular	ondulado	umbonada	dura	amarilla
AZO-13	puntiforme	entero	elevada	pegajosa	naranja
FCC-20	circular	ondulado	convexa	pegajosa	naranja
AZO-11	circular	crenado	plana	butirosa	transparente
BEI-26	puntiforme	entero	elevada	pegajosa	crema

**Anexo 9.** Morfología microscópica de bacterias encontradas en la filosfera y rizosfera de ilama (*Annona diversifolia* Saff.).

Cepa	Forma	Agrupación	Prueba de Gram
AZT-15	esférica (cocos)	cocos solos	negativa
FCC-19	cilíndrica (bacilos)	bacilo corto (cocobacilo)	negativa
FCC-25	esférica (cocos)	pares (diplococos)	negativa
BEI-27	espiral	espira en un tercio del cilindro (vibrio)	negativa
BEI-29	cilíndrica (bacilos)	bacilos rectos	negativa
DER-1	esférica (cocos)	tetrados (tétradas)	negativa
NFB-2	espiral	espiras abiertas (espirila)	negativa
AZO-13	esférica (cocos)	pares (diplococos)	negativa
FCC-20	esférica (cocos)	pares (diplococos)	negativa
AZO-11	espiral	espira en un tercio del cilindro (vibrio)	negativa
BEI-26	espiral	espiras abiertas (espirila)	negativa