



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

*CAMPUS* MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

**MICORRIZA ARBUSCULAR, BACTERIAS  
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL Y  
FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN EL CONTENIDO  
DE CAROTENOIDES DE *Calendula officinalis***

BRIGSANIA ALMAZAN GALINDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: Micorriza arbuscular, bacterias promotoras de crecimiento vegetal y fertilización nitrogenada en el contenido de carotenoides de caléndula (*Calendula officinalis*) realizada por la alumna Brigsania Almazan Galindez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

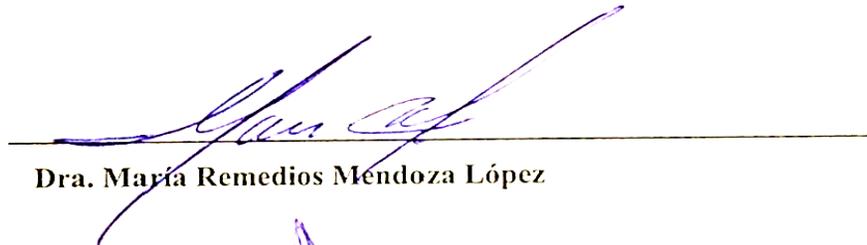
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



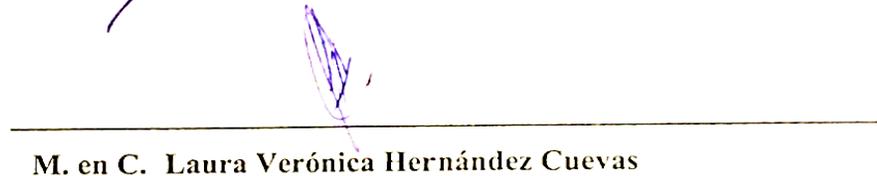
Dr. Julián Delgadillo Martínez

ASESOR



Dra. María Remedios Mendoza López

ASESOR



M. en C. Laura Verónica Hernández Cuevas

Montecillo, Texcoco, México, Junio de 2015



La presente tesis “**Micorriza arbuscular, bacterias promotoras de crecimiento vegetal y fertilización nitrogenada en el contenido de carotenoides de *Calendula officinalis***”, fue parcialmente financiada por el proyecto: **SEP-CONACYT 130262 “Biotecnología microbiana para inducir la acumulación de metabolitos de interés farmacéutico en plantas medicinales”**.

**MICORRIZA ARBUSCULAR, BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO  
VEGETAL Y FERTILIZACIÓN NITROGENADA EN EL CONTENIDO DE  
CAROTENOIDES DE *Calendula officinalis***

**Brigsania Almazan Galindez, M. C.**

**Colegio de Postgraduados, 2015**

**RESUMEN**

Este estudio evaluó crecimiento, desarrollo e incremento de carotenoides, en plantas de *Calendula officinalis*., establecidas en invernadero, sometidas a fertilización nitrogenada por aplicaciones de nitrato de amonio (25%) y *Azolla* (12.5%) e inoculación micorrizica y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. El presente trabajo fue dividido en tres fases experimentales. La primera fase describe la fertilización nitrogenada con nitrato de amonio (aplicado en solución Jensen) y *Azolla* seca y molida (aplicada en combinación con el sustrato) ambos a diferentes dosis (12.5, 25, 37.5, 50, 70 y 100%). En la segunda fase se evaluó el uso de rizotrones para ver la afinidad y crecimiento de las raíces de caléndula hacia *Azolla*, para ello, se usó *Azolla* seca y molida al 12.5 y 75% en combinación con el sustrato. Finalmente, en la tercera fase se realizó una aplicación de: nitrato de amonio al 25% ( $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ ) y *Azolla* seca y molida al 12.5%, inoculación con hongo micorrízico arbuscular (HMA, *Rhizophagus intraradices*) y bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV, consorcio) en plantas de *C. officinalis*., la aplicación de las dosis nitrogenadas fue en base a resultados obtenidos en el primer capítulo, HMA y BPCV se inocularon solos o en combinación con *Azolla* y  $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ . Como conclusiones generales, se tiene que la fertilización con *Azolla* 12.5 y 25%, por si sola o en combinación con BPCV y HMA incremento el contenido de carotenoides y otras variables dentro del crecimiento y desarrollo de caléndula. La aplicación de  $\text{NH}_4 \text{NO}_3$  a sus diferentes dosis, aplicado solo o en combinación con BPCV y HMA incrementó el crecimiento y desarrollo de caléndula más no el contenido de carotenoides, ya que no hubo presencia de botón floral. Las plantas inoculadas con HMA o BPCV no mostraron presencia de botón floral, al igual que los testigos (absoluto y con  $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ ). Por otra parte, la aplicación de  $\text{NH}_4 \text{NO}_3$  o *Azolla* disminuyó la colonización micorrizica.

**Palabras clave:** planta medicinal, metabolitos secundarios, fertilización, caléndula.

**ARBUSCULAR MYCORRHIZAL, PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA AND  
NITROGEN FERTILIZATION OF THE CAROTENOID CONTENT OF *Calendula  
officinalis***

**Brigsania Almazan Galindez, M. C.**

**Colegio de Postgraduados, 2015**

**ABSTRACT**

This study evaluated growth, development and increased carotenoids in plants *Calendula officinalis*., Established in greenhouses, under nitrogen fertilization by applications of ammonium nitrate (25%) and Azolla (12.5%) and mycorrhizal inoculation and growth promoting bacteria vegetable. The present work was divided into three experimental phases. The first phase described nitrogen fertilization with ammonium nitrate (Jensen solution applied) and Azolla dried and ground (applied in combination with the substrate) both at different doses (12.5, 25, 37.5, 50, 70 and 100%). In the second phase using rhizotrons evaluated for affinity and root growth towards Azolla calendula, for this, dried and ground Azolla 12.5 and 75% in combination with the substrate used. Finally, in stage application it was made: ammonium nitrate 25% ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) and Azolla dried and ground to 12.5%, inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF, intraradices *Rhizophagus*) and promoting bacteria plant growth (PGPR, consortium) in plants of *C. officinalis*., the application of nitrogen doses was based on results obtained in the first chapter, AMF and PGPR inoculated alone or in combination with Azolla and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . As a general conclusion, it must fertilization Azolla 12.5 and 25%, alone or in combination with PGPR and AMF increase the content of carotenoids and other variables in the growth and development of calendula. The application of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  to its different doses, applied alone or in combination with HMA PGPR increase growth and development and no calendula more carotenoid content, as no presence of flower bud. The inoculated with HMA or PGPR plants showed no presence of flower bud, as the (absolute and nutrient solution) controls. Moreover, the application of Azolla  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  or decreased mycorrhizal colonization.

**Keywords:** medicinal plant secondary metabolites, fertilization, calendula

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por las facilidades proporcionadas para realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para el desarrollo de esta investigación la cual forma parte de mi formación profesional.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), por la beca proporcionada para la elaboración de la tesis.

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato. Por la formación y orientación académica en la realización de esta investigación, por su disciplina y cariño.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez. Por su apoyo en la revisión del escrito, sus consejos, paciencia y tiempo brindado. Su ayuda fue fundamental en la culminación de este escrito, muchas gracias.

Al Dr. Alejandro Alarcón. Por su apoyo en la revisión del escrito, sus consejos y tiempo brindado. Muchas gracias.

A mi consejo particular: Dr. Julián Delgadillo-Martínez, Dr. Alejandro Alarcón, M en C Laura Verónica Hernández-Cuevas, Dra. María Remedios Mendoza-López, M en C Alejandrina Ruiz Bello. Por su ayuda y sugerencias para mejorar el trabajo científico.

Al personal del Área de Microbiología, por su apoyo en el laboratorio y amistad brindada durante mi estancia. Pero muy en especial a doña Rosario Galicia por su amistad y atención prestada.

A la M en C María Encarnación Lara-Hernández, por su apoyo y amistad. A Doña Remedios, por su amistad y apoyo.

A mis compañeros y amigos, Itzel, Deisy, Claudia, Noe<sup>□</sup>, Vivian, Salvador, Heidi, Concepción, Azareel, Erickson, Celly, Faustino, Alfonso, Angeles, Lucio, Lupita, M en C Jazmin, Dr. Ballesteros, Dr. Juan Jose, Dr. Jesus, M en C Tocuch, M en C Alicia, M en C Mariela, Dras.

Alejandra, Claudia y Esmeralda, M en C Cristina y Yadira. A Daniel mi amigo, compañero y novio, gracias por tu apoyo incondicional.

### **DEDICATORIA**

A dios por darme salud y permitirme realizar uno más de mis objetivos.

A María de Jesus Galindez-Terrones, quien ha sabido ser padre y madre para mi, por brindarme su confianza, ternura, amor y consejos., por apoyarme en mi sueños y metas, quien ha sabido educarme y enseñarme el valor del trabajo y gracias por demostrarme que aquellos caminos más largos y que más esfuerzo te suponen , son en la meta los mas satisfactorios.

A toda mi familia, quienes me han brindado su apoyo incondicional, amor y comprensión, por estar siempre a mi lado y enseñarme siempre el valor de la unidad.

## CONTENIDO

<b>Tabla de contenido</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>vi</b>
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO I.....	3
Crecimiento de <i>Calendula officinalis</i> con fertilización nitrogenada (nitrato de amonio) y Azolla a diferentes concentraciones .....	3
Resumen .....	3
Abstract.....	3
Introducción.....	5
Materiales y métodos.....	6
Resultados.....	9
Peso seco aéreo y radical .....	9
Área foliar y número de hojas .....	10
Número y peso seco de botones florales .....	12
Volumen radical .....	14
Discusión .....	15
Criterios fisiológicos y morfológicos de la aplicación nitrogenada .....	15
Conclusiones.....	16
CAPÍTULO II.....	17
Desarrollo de la raíz de <i>Calendula officinalis</i> en sustrato con Azolla.....	17
Resumen .....	17
Abstract.....	17
Introducción.....	19
Materiales y métodos.....	20
Resultados.....	22
Crecimiento de la raíz de caléndula.....	22
Discusión .....	27
Conclusiones.....	27
CAPÍTULO III.....	28
Efecto de la inoculación con hongo micorrízico arbuscular (HMA) y de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) en el contenido de carotenoides de <i>C.</i> <i>officinalis</i> con aplicación de Azolla o nitrato de amonio .....	28
Resumen.....	28

Abstract .....	29
Introducción .....	30
Materiales y métodos .....	32
Selección y confrontación de cinco cepas bacterianas .....	32
Conteo de esporas de Rhizophagus intraradices .....	34
Producción de planta .....	35
Preparación de inóculo bacteriano (consorcio) .....	35
Diseño experimental y tratamientos aplicados .....	36
Evaluación de las variables después de 152 días del trasplante (ddt) .....	37
Determinación de carotenoides .....	38
Resultados .....	40
Criterios fisiológicos y morfológicos de la aplicación con Azolla y nitrato de amonio ....	40
Clorofila de las plantas de caléndula .....	45
Efecto en la colonización micorrizica .....	49
Discusión .....	52
Criterios fisiológicos y morfológicos de la aplicación con Azolla y nitrato de amonio ....	52
Clorofila de las plantas de caléndula .....	54
Efecto en la colonización micorrizica .....	56
Efecto de la fertilización nitrogenada en el contenido de carotenoides totales .....	57
Conclusiones .....	58
CAPÍTULO IV .....	59
Conclusiones generales .....	59
CAPÍTULO V .....	60
Bibliografía .....	60
CAPITULO VI .....	72
Anexos .....	72

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Latinoamérica constituye la región más rica en diversidad vegetal a nivel mundial; Brasil, Colombia, Perú, Venezuela y México se destacan por presentar mayor número de especies (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008). Aproximadamente el 50% de diversidad se emplea para satisfacer alguna necesidad humana, y desde luego las plantas medicinales (PM) ocupan el principal porcentaje (Estrada, 2002). En relación con el uso de PM silvestres, podemos decir que de los países latinoamericanos, México encabeza la lista con mayor diversidad vegetal, estimándose que existen cerca de 30,000 especies de plantas de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, esto es el 10% de la riqueza florística del país (Bye y Linares, 1999). En relación con el uso de especies medicinales, el número de plantas que han sido estudiadas fitoquímicamente no rebasan el 10% y evaluadas farmacológicamente son menos del 5% y las estudiadas agrónomicamente no llegan al 1% (Fierro-Álvarez, 2011). Más del 90% de las PM son silvestres, esta es la razón por la que el resto de la población hace uso de las plantas medicinales, ya que en algunas ocasiones es el único recurso biológicamente disponible y accesible en términos culturales y económicos (Hersch, 2000). Éstas se venden en los mercados nacionales y en el extranjero, lo cual indica un consumo a la alza de plantas medicinales a nivel nacional e internacional, y por lo tanto, se vuelve una urgencia desarrollar técnicas y metodologías para la propagación, la domesticación y la introducción al cultivo de este tipo de plantas. A diferencia de las plantas alimenticias en donde lo que importa son los números de producción por hectárea, en las plantas medicinales lo que se busca es una mayor concentración de las sustancias curativas (principios activos), además de que en su manejo no se pueden utilizar plaguicidas y agroquímicos por su eventual efecto tóxico (Fierro-Álvarez *et al.*, 2011).

Las plantas son fuente de una amplia variedad de compuestos químicos, conocidos como metabolitos secundarios, que son utilizados como fármacos, bioplaguicidas, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros. Comúnmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o cultivadas, lo que tiene una serie de desventajas. Su acumulación en las plantas es baja y lenta, ya que está regulada espacial y temporalmente. Es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés (Verporte *et al.*, 2002). Pero actualmente, entre los esfuerzos constantes que están haciendo los investigadores para mejorar la producción de los compuestos derivados

de las plantas (metabolitos secundarios), se encuentra el uso de microorganismos del suelo como co-cultivos por biotización (es decir, la respuesta metabólica de un material vegetal crece junto a un inoculante microbiano, que conduce al desarrollo, cambios fisiológicos y mejora abiótica y biótica, a la resistencia a estrés de los propágulos mejorados), lo que promueve la asociación simbiótica de HMA y bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) en las plantas, estimulando así su crecimiento, aumento de biomasa, resistencia a patógenos e influir en el contenido de metabolitos secundarios de las PM (Gianinazzi *et al.*, 2010; Raviv, 2010; Soundarapandian y Dhandayuthapani, 2010; Vestberg *et al.*, 2011).

Por lo anterior, el estudio sobre las interacciones microorganismos-PM, para producir niveles deseados o mejorados de metabolitos secundarios (fitoquímicos) es fundamental, y en el cual el uso de BPCV y HMA juegan un papel determinante, siendo su presencia de suma importancia para la calidad y la acumulación de metabolitos secundarios, y como fuente en la síntesis de fitoquímicos (Kapoor *et al.*, 2007; Soundarapandian y Dhandayuthapani, 2010).

## CAPÍTULO I

### **Crecimiento de *Calendula officinalis* con fertilización nitrogenada (nitrato de amonio) y *Azolla* a diferentes concentraciones**

#### **Resumen**

Actualmente por la crisis de energía y el alto costo de los fertilizantes químicos, se le ha brindado notable interés al uso de otras alternativas nutricionales más económicas y amigables con el ambiente, especialmente, para aportar nitrógeno. Una de ellas es el uso de *Azolla* como abono verde, bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico y hongos micorrízicos arbusculares en los cultivos. Con base en el contexto de que la fertilización nitrogenada con *Azolla* y nitrato de amonio es una práctica cultural que mejora la calidad de la planta, siempre y cuando la concentración de estos sea la apropiada; se examinaron los efectos de cinco concentraciones de fertilización nitrogenada (12.5, 25, 37.5, 50 y 100%), con nitrato de amonio o *Azolla* seca y molida, en plantas de caléndula mediante la evaluación de diversos indicadores morfológicos y fisiológicos de calidad. Existió una diferencia entre ambas fertilizaciones; no obstante, de manera independiente cada fertilización influyó en los indicadores evaluados. La fertilización con *Azolla* al 12.5 y 25% mostraron efectos significativos para diferentes variables (número de hojas, área foliar, número de botones y peso seco), mientras que a concentraciones de 37.5, 50 y 100%, la planta no logró sobrevivir. En cambio, la fertilización con nitrato de amonio mostró efectos benéficos en las plantas de caléndula en todas las concentraciones usadas. Los efectos más significativos se presentaron en las concentraciones 25, 50 y 100%, para peso seco, área foliar, número de hojas y número de botón. Los resultados obtenidos en el ensayo de prueba indica que la fertilización permite a las plantas desarrollarse satisfactoriamente cuando la baja disponibilidad de nutrimentos es un factor limitante.

**Palabras clave:** nitrógeno, botón de oro, calidad.

#### **Abstract**

Currently by the energy crisis and the high cost of chemical fertilizers, it has given him considerable interest to the use of other nutritional cheaper and environmentally friendly alternatives, especially, to provide nitrogen. One is the use of *Azolla* as green manure, atmospheric nitrogen fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on crops. Based on the context of that fertilization with nitrogen and ammonium nitrate *Azolla* is a cultural practice that

improves the quality of the provided floor and when the concentration of these is appropriate; the effects of five concentrations of nitrogen fertilization (12.5, 25, 37.5, 50 and 100%), ammonium nitrate or dried and ground Azolla, marigold plants by evaluating various morphological and physiological indicators of quality were examined. There was a difference between the two fertilizations; however, each fertilization independently influenced the indicators evaluated. Azolla fertilization 12.5 and 25% showed significant effects for different variables (number of leaves, leaf area, number of buttons, dry weight), while concentrations of 37.5, 50 and 100%, the plant did not survive. In contrast, ammonium nitrate fertilization showed beneficial effects on plants calendula all concentrations used. The most significant effects were seen at concentrations 25, 50 and 100% for dry weight, leaf area, number of leaves and number button. The results obtained in testing indicate fertilization test that allows plants to grow successfully when low nutrient availability is a limiting factor.

**Keywords:** nitrogen, buttercup, *Azolla*.

## Introducción

La caléndula (*Calendula officinalis*) tiene origen europeo y se conoce popularmente como maravilla, botón de oro y margarita. Su floración es anual y las partes que se utilizan son: hojas y capítulos (flores) como terapéuticos, pero la planta completa también puede ser utilizada como ornamental o como fitorremediador en suelos contaminados con Cd y Pb (Liu *et al.*, 2008). Tiene propiedades curativas y antisépticas (uso externo), la acción es sudorífica, antiviral, vasodilatadora y ayuda a tonificar la piel (Sigedar *et al.*, 1991; Liu, 2009). Además de estas acciones, los capítulos de caléndula son antioxidantes, pues Preethi *et al.*, (2006) determinaron que es capaz de reducir los radicales libres producidos en el cuerpo de los seres humanos (Gazim *et al.*, 2008). El florecimiento de la caléndula se inicia alrededor de dos meses después de la siembra y tiene una duración de dos o tres meses. Puede producir 720 kg de inflorescencias secas ha<sup>-1</sup> (Martins *et al.*, 1994). Gomes *et al.*, (2007) observaron floración temprana a 45 días después de la siembra de las plántulas. Las plantas prefieren suelos bien drenados, ricos en materia orgánica, profundos y permeables, suelos fértiles y húmedos. No tolera suelos inundados ni arenosos y secos (Castro y Chemale, 1995).

En cuanto a la fertilización, se han realizado estudios con N (urea) a las siguientes dosis: 10, 20 y 40 g m<sup>-2</sup> y 15 y 30 g m<sup>-2</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (superfosfato) más 10 g m<sup>-2</sup> y 5 kg m<sup>-2</sup> de estiércol, Barman y Pal (1994) observaron que la altura de las plantas, el número y masa de mil semillas de caléndula aumentaron con la adición de nitrógeno. Usando 25 a 50 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 50 y 100 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno. Sigedar *et al.*, (1991) obtuvieron con 100 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno el mayor número de hojas, ramas, masa e inflorescencias.

Por otro lado, los fertilizantes orgánicos pueden servir como alternativa a los fertilizantes minerales ya que mejoran la estructura del suelo y son más económicos (Dauda *et al.*, 2008), ejemplo de ellos son: microorganismos como bacterias, algas y hongos solo o en combinación que pueden ayudar a aumentar la productividad de los cultivos vivos (Tilak y Reddy, 2006) . *Azolla* es un helecho acuático con pequeñas hojas alternas, que vive en simbiosis con cianobacterias (algas), las cuales fijan el nitrógeno atmosférico y posee generalmente una alta concentración de nutrientes (Becerra, 1991; García *et al.*, 2001); este puede ser usado con alta eficacia para abastecer de nutrientes a los cultivos y mejorar los sustratos (Van-Hove, 1989), ya que es el abono verde más eficiente usado en cultivo de arroz y puede ser trasladado a otros cultivos.

Para ello es necesario investigar varios aspectos de este en nuestro país, en especial en plantas que demandan grandes cantidades de nitrógeno; como es el caso de plantas medicinales.

### Materiales y métodos

Este estudio se realizó en un invernadero del Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México, donde se presenta una temperatura media de 24 °C día y 20 °C noche, un fotoperiodo de 12 h. Se determinó la concentración de nitrógeno (método de Kjeldahl) en las diferentes especies de *Azolla* y *Lemna* (Cuadro 1) utilizadas como abono. Con base en los resultados de laboratorio se determinó que existen diferencias en el contenido de nitrógeno de la asociación *Azolla-anabaena*, en las diferentes especies de *Azolla* (Cuadro 1). De acuerdo al contenido de nitrógeno, se usó como abono verde las colectas: Tlaxco, Texmelucan, Atlangatepec, Coyote y Ensenada (combinadas).

**Cuadro 1.** Especies de *Azolla* y *Lemna* usadas como abono verde.

<b>Especie (colecta)</b>	<b>Contenido de Nitrógeno</b>
Tlaxco ( <i>A. filiculoides</i> )	2%
CEG ( <i>Azolla</i> sp)	1%
Texmelucan ( <i>A. filiculoides</i> )	3%
Atlangatepec ( <i>A. filiculoides</i> )	3%
Hidalgo ( <i>Azolla</i> sp)	0.2%
Coyote ( <i>A. filiculoides</i> )	2.5%
Lentejilla ( <i>Lemna gibba</i> )	1%
Ensenada ( <i>Azolla</i> sp)	3%

Se evaluó el efecto de los tratamientos (a diferentes dosis) sobre el crecimiento, morfología y rendimiento de las plantas de caléndula. Para ello, se usaron plántulas de *Calendula officinalis*, variedad calipso, flor naranja-amarilla, provenientes del invernadero Plántulas de Tetela, S. de R. L. de C. V. del estado de Morelos, con 15 días de germinación en semilleros con agrolita y turba. Después de los 15 días de germinación de las plántulas, se realizó el trasplante de caléndula a macetas con 60 g de capacidad, las cuales se llenaron con Agrolita y turba en una relación 2:3 (2 kg: 3 kg) previamente esterilizados en húmedo a 121°C durante tres horas por tres días consecutivos. Como tratamientos se utilizó nitrato de amonio en las siguientes dosis: 12.5%,

25%, 37.5%, 50%, 70% y 100% y *Azolla* (combinación de las colectas arriba mencionadas) seca y molida a diferentes dosis (12.5%, 25%, 37.5%, 50%, 70% y 100%), nitrato de amonio en dosis equivalentes a las usadas para *Azolla*.

El nitrato de amonio fue aplicado en riegos cada 8 días con la solución nutritiva Jensen (Anexo 6.1.a) y la *Azolla* se combinó con el sustrato (fue secada a 70°C por tres días consecutivos en estufa Jouan Quality System) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Tratamientos con *Azolla* (porcentaje respecto al sustrato y cantidad por maceta).

Porcentaje	g maceta <sup>-1</sup>
100	60
70	18
50	30
37.5	22.5
25	15
12.5	7.5

Para la dosificación de fertilizante inorgánico nitrogenado (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) se hizo lo siguiente:

De acuerdo al peso molecular del nitrato de amonio (80.043):

$$N \ 14 \times 2 = 28$$

$$H \ 1 \times 4 = 4$$

$$O \ 16 \times 3 = 48$$

$$1 \text{ mol} \longrightarrow 28 \text{ g}$$

$$0.016 \text{ (mol)} \longrightarrow ?$$

$$X = 0.448 \text{ g}$$

Entonces tenemos que 0.016 mol es igual a 0.448 g, se realizó una regla de tres para saber la cantidad de nitrato correspondiente a los porcentajes a utilizar.

$$28 \text{ g N} \longrightarrow 80.043 \text{ g}$$

$$0.448 \text{ g} \longrightarrow ?$$

$$X = 1.281 \text{ g (100\%)}$$

En base a esto se determinaron los gramos de nitrato de cada porcentaje (Cuadro 3), el nitrato se disolvió en un litro de solución nutritiva Jensen y se aplicó semanalmente.

**Cuadro 3.** Tratamientos con nitrato de amonio (porcentaje y cantidad aplicada).

<b>Porcentaje</b>	<b>g L<sup>-1</sup> de solución Jensen</b>
<b>100</b>	1.281
<b>70</b>	0.896
<b>50</b>	0.64
<b>37.5</b>	0.48
<b>25</b>	0.32
<b>12.5</b>	0.16

Cada tratamiento constó de cinco replicas (una planta por maceta), estas se mantuvieron en condiciones de invernadero a lo largo del experimento, bajo las condiciones arriba mencionadas. El seguimiento de las condiciones de invernadero a lo largo del experimento se hizo con una mini-estación Hobo 2CHNL (Thomas scientific ®). Durante todo el experimento las plantas fueron irrigadas diariamente con 50 mL de agua destilada y semanalmente se aplicaron 5 mL de la solución estéril Jensen (Jensen y Collins, 1985) (sin nitrógeno para las plantas con *Azolla* y los testigo y con nitrato de amonio a diferentes dosis para los tratamientos con nitrógeno) ajustada a un pH de 5.8.

A los 45 días después del trasplante (ddt) se evaluó el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento y rendimiento de las plantas de *Calendula officinalis*, evaluando las siguientes variables:

- peso seco de hojas
- peso seco de la raíz (secado a 70 °C por 48 h)
- número y peso de botones florales
- número de hojas
- área foliar
- volumen radical

Todas las plantas fueron cosechadas, para separar la parte aérea de la parte radical. Una vez separadas las hojas se procedió a medir el área foliar mediante un integrador de área foliar (LI-COR modelo LI-3100) y después se colocaron en bolsas de papel para secarlas a 70°C durante tres días, luego pesadas para registrar su peso seco. Por otra parte, las raíces fueron lavadas y secadas con papel absorbente para posteriormente medir el volumen radical mediante el método de desplazamiento de volumen de agua en probeta (cm<sup>3</sup>).

La comparación de los efectos de los factores sobre los indicadores morfológicos y fisiológicos de la fertilización se realizó a través del análisis de la varianza (ANOVA). Los efectos se consideraron significativos cuando el valor de *P* fue menor a 0.05. Cuando los efectos resultaron significativos, las diferencias estadísticas entre medias se identificaron mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher ( $\alpha= 0.05$ ). Los supuestos del ANOVA (normalidad y homogeneidad de varianzas) se validaron. El análisis estadístico de los datos se hizo con el software SAS (Statistical Analysis System) para Windows Versión 9.0.

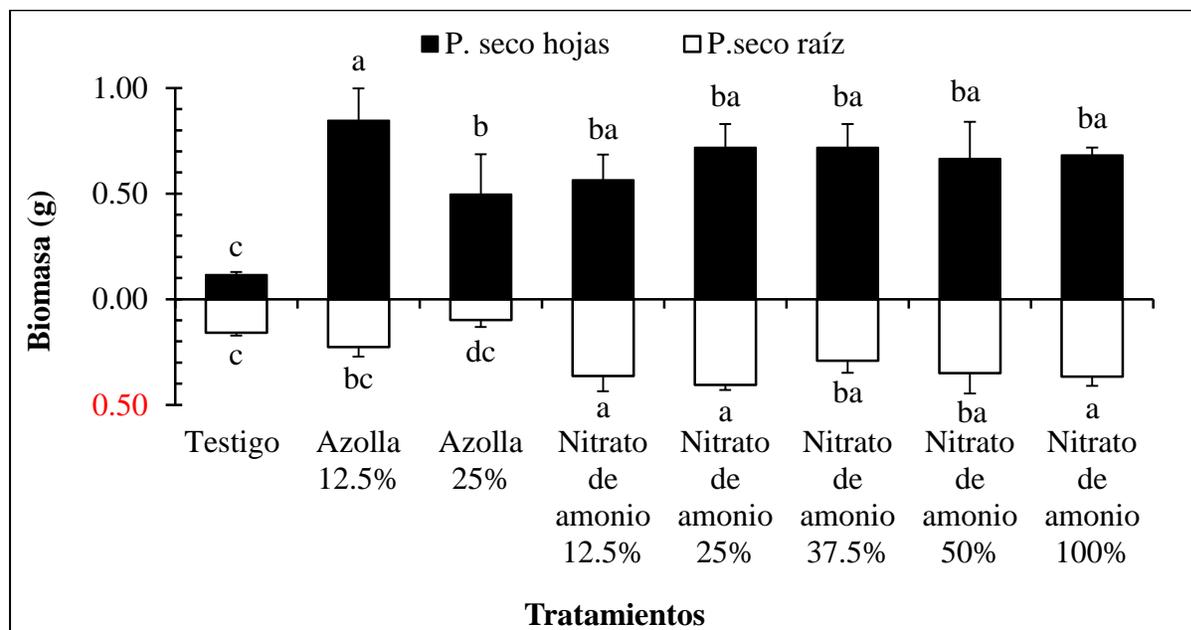
## **Resultados**

### **Peso seco aéreo y radical**

De acuerdo con el ANOVA, los criterios morfológicos y fisiológicos evaluados de la aplicación nitrogenada con *Azolla* en las concentraciones 37.5, 50 y 100% no presentaron efectos significativos por la interacción del régimen de fertilización, ya que resultaron ser tóxicas para la planta. Pero, si hubo diferencias significativas por los efectos de las concentraciones 12.5 y 25% de *Azolla* en comparación con el testigo, favoreciendo los valores más elevados sobre las variables en las cuales tuvieron influencia. Con nitrato de amonio, las respuestas más contrastantes relacionadas con la morfología y fisiología se presentaron en las concentraciones 25 y 50%, en las otras concentraciones no hubo efecto negativo como en el caso de *Azolla*.

En peso seco de la parte aérea y de la raíz, el testigo sin fertilización presentó 0.11 g en promedio, 0.15 g en promedio por planta para peso seco en raíz (Figura 1), en comparación con los tratamientos fertilizados con *Azolla* con 0.66 g de peso seco aéreo, 0.6 g para peso seco de raíz por planta y para nitrato de amonio 0.5 g de peso seco aéreo y 0.34 g para peso seco de raíz, en promedio por planta (Figura 1). Cabe destacar que aplicar *Azolla* en proporción de 37.5% o mayores, provoca la muerte de las plantas. Además, no obstante que con la aplicación de 12.5 y

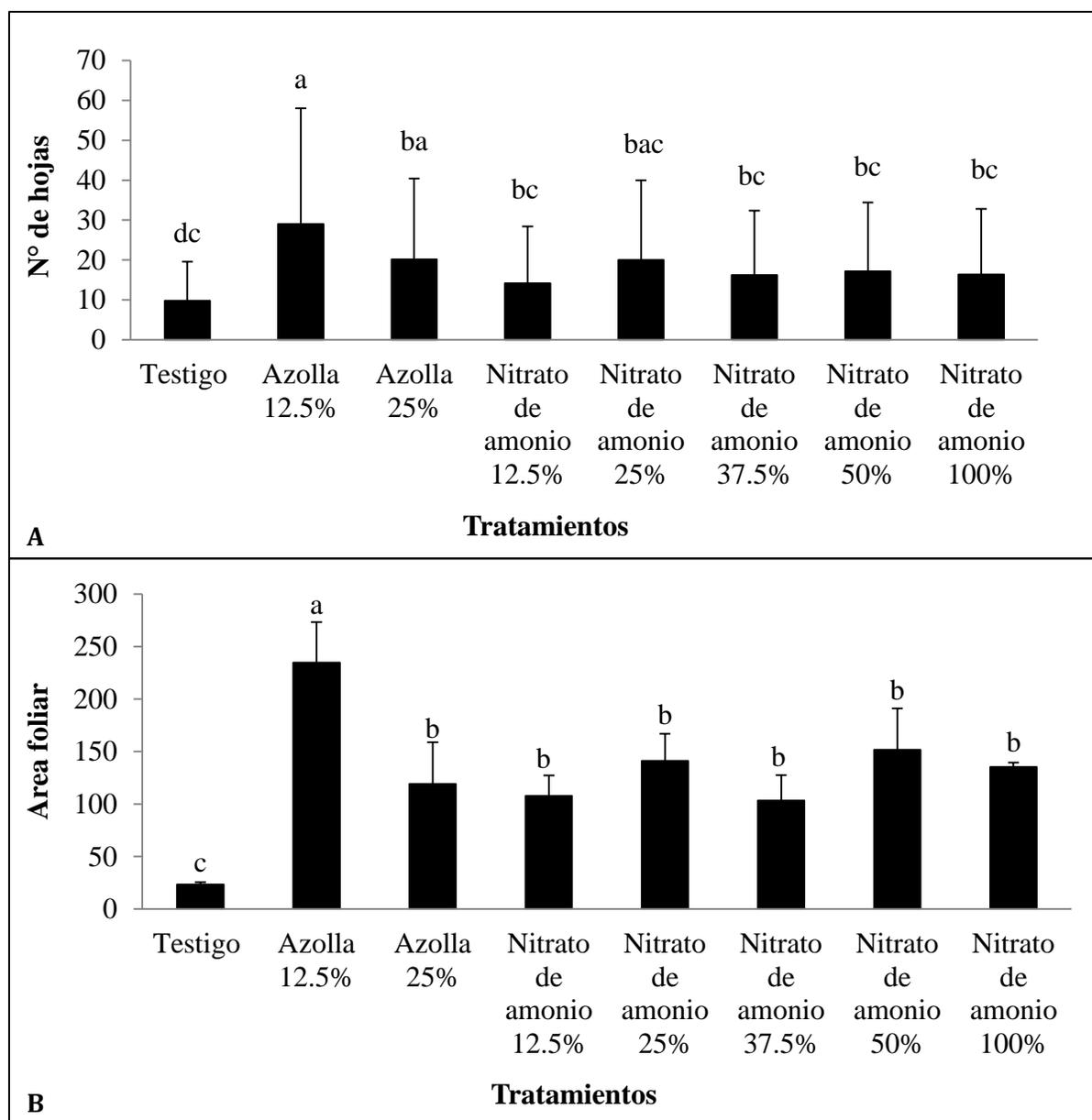
25% de *Azolla* las plantas desarrollaron una biomasa aérea similar a la de las plantas fertilizadas con nitrato de amonio, el sistema radical tuvo menor crecimiento en las plantas con *Azolla*, lo que puede indicar un efecto inhibitorio de este helecho ó durante su descomposición. Lo anterior fue mucho más evidente en el tratamiento con 12.5% de *Azolla*, donde se presentó una producción de biomasa aérea que superó a los tratamientos restantes y una raíz de las menos desarrolladas (Figura 1).



**Figura. 1.** Efecto de la fertilización con *Azolla* y nitrógeno en sus diferentes concentraciones, en peso seco de hoja y raíz, a los 45 ddt. Los valores por debajo de 0.0 son también positivos, usados para relacionar parte aérea y radical. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente gráfica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha=0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.

### Área foliar y número de hojas

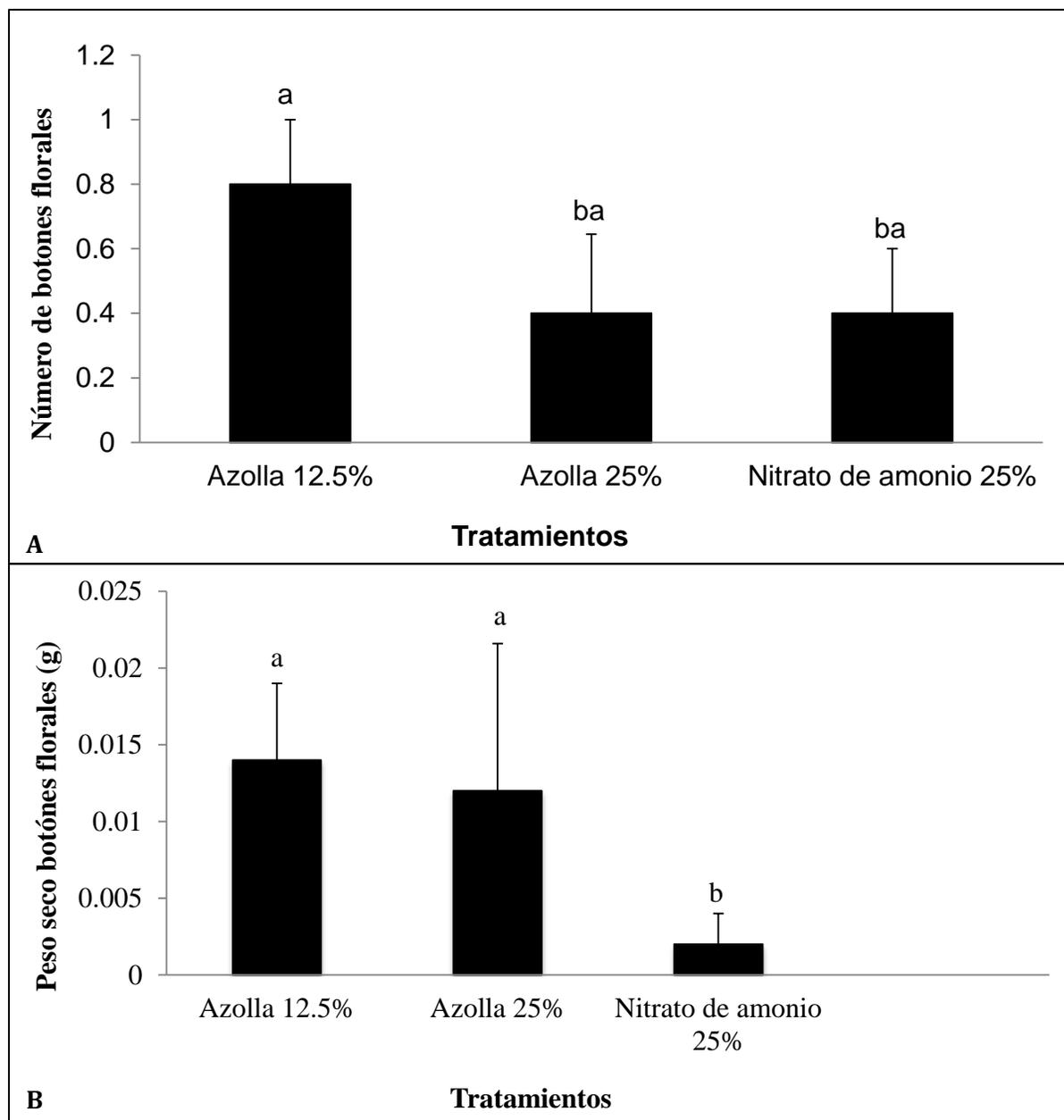
De acuerdo a los resultados obtenidos, para área foliar se obtuvo 23.2 cm<sup>2</sup> en promedio para testigo y 9.8 hojas en promedio por planta; con relación a las plantas fertilizadas con nitrato de amonio se obtuvo 127 cm<sup>2</sup> de área foliar y 16 hojas en promedio; para *Azolla* 176 cm<sup>2</sup> de área foliar y 24.5 hojas en promedio (Figura 2A y 2B). Al igual que el peso seco de la parte aérea y de la raíz, el tratamiento más destacado fue el de la aplicación con *Azolla* 12.5% el cual superó a los tratamientos restantes en área foliar, incluyendo a los tratamientos con nitrato de amonio (Figura 2). Los valores más bajos se presentaron en el testigo, en *Azolla* 37.5, 50 y 100% las plantas se murieron.



**Figura. 2.** Efecto de la fertilización con *Azolla* y nitrato de amonio en sus diferentes concentraciones, en número de hojas (A) y área foliar (B) a los 45 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente gráfica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha= 0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.

### **Número y peso seco de botones florales**

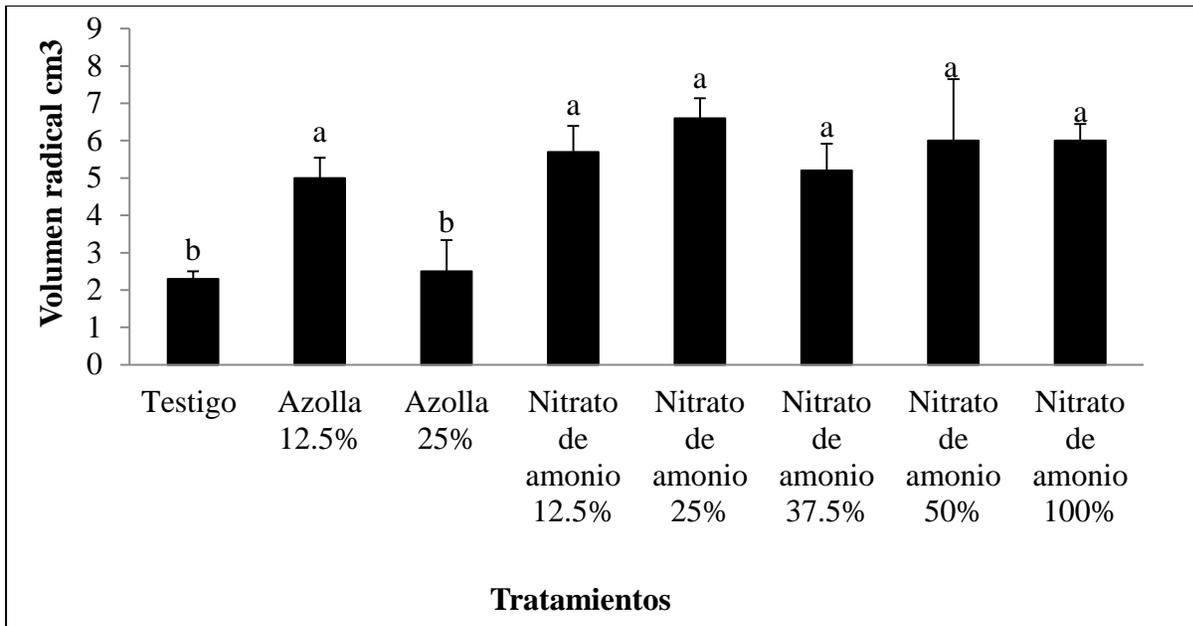
Para número de botones, no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con *Azolla* a 12.5% y 25% (con 0.8 y 0.4 botones en promedio por planta, respectivamente) y en nitrato de amonio a 25% (0.4 botones por planta), en comparación con el testigo y demás concentraciones de fertilización. En estos últimos tratamientos no se presentó emergencia de botón y por lo tanto no hubo presencia de floración a los 45 días después del trasplante (Figura 3A). El mismo efecto sucedió para peso seco en botón, en donde no hubo efecto significativo para el tratamiento fertilizado con *Azolla* 12.5% (0.013g por planta en promedio) y nitrato de amonio (0.001g en promedio) y el testigo sin fertilización, que no presentó emergencia de botón y no hubo floración (Figura 3B).



**Figura. 3.** Efecto de la fertilización con *Azolla* y nitrato de amonio en sus diferentes concentraciones, en número (A) y peso seco botones florales (B) a los 45 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente gráfica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha=0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.

## Volumen radical

En cuanto a volumen radical, se obtuvo diferencia significativa en los tratamientos fertilizados con nitrato a sus diferentes concentraciones ( $5.9 \text{ cm}^3$  en promedio por planta),  $3.75 \text{ cm}^3$  en promedio para los tratamientos con *Azolla* y  $2.3 \text{ cm}^3$  en el testigo absoluto (Figura 4).



**Figura. 4.** Efecto de la fertilización con *Azolla* y nitrato de amonio en sus diferentes concentraciones, en volumen radical a los 45 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente gráfica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha=0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar. El tratamiento con 12.5% de *Azolla* superó al de 25%, lo que indica un posible efecto inhibitorio del abono verde, o en su caso, compuestos que impiden el crecimiento de la raíz y que son liberados durante la descomposición de la *Azolla*.

## Discusión

### Criterios fisiológicos y morfológicos de la aplicación nitrogenada

De acuerdo con los resultados de este estudio, en plantas de *Calendula officinalis*, la fertilización nitrogenada ya sea con *Azolla* o nitrato de amonio mejoran la calidad morfológica de la planta, excepto en el tratamiento con *Azolla* mayor a 25%, ya que las plantas trasplantadas no sobrevivieron. Vieira *et al.*, (1999) observaron que en la fase inicial del ciclo de la planta predomina el crecimiento vegetativo y que comienza con la formación de capítulos, que son cortos y más tarde se alargan, lo que refleja el crecimiento acelerado de la planta entre 30 y 60 días después del trasplante y la cosecha de caléndula comienza alrededor de dos meses después de la siembra y se prolonga durante dos o tres meses más (Martins *et al.*, 1994).

Las plantas de caléndula en todos los tratamientos crecieron normalmente a lo largo del periodo de estudio (45 días después del trasplante). Sin embargo, no había prácticamente alturas homogéneas en las plantas. El crecimiento rápido de *Calendula* entre (30 y 35 días después del trasplante) provocó la aparición y desarrollo del botón floral así como el aumento del número de hojas en los tratamientos *Azolla* 12.5 y 25%, y nitrato de amonio 25, (Figura 2 y 3). Las plantas de caléndula responden a los tratamientos con nitrógeno a una dosis de  $84 \text{ mg dm}^{-3}$ , con un aumento en la producción de biomasa fresca y seca de la parte aérea a los 15, 30, 45, 60 y 90 días después del trasplante (Serra *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha reportado el uso de *Azolla* como fertilizante nitrogenado en cultivos de lechuga, logrando incrementar el rendimiento y sus componentes en peso seco y fresco a una dosis de  $1.0 \text{ kg m}^{-2}$ , esto se debe al aporte de nutrientes al descomponerse el helecho y a mejores condiciones físico-químicas que se crean en el sustrato con la aplicación de este abono verde (Quintero, 1995; Castro *et al.*, 2009). No existen reportes particulares del uso de *Azolla* como abono para esta especie de caléndula; no obstante, el efecto favorable del suministro de *Azolla* como fertilizante nitrogenado a diferentes dosis sobre el crecimiento y demás características relacionadas con el crecimiento y desarrollo de cultivos agrícolas ha sido estudiado por Van-hove, (1989), Bharati *et al.*, (2000), Aurora y Singh (2003) y Castro *et al.*, (2009).

La promoción de un mayor crecimiento y la expansión foliar propicio el aprovechamiento de recursos (luz,  $\text{CO}_2$ ) (Figura 1A). Gröen (1973) reportó altas tasas fotosintéticas en plantas de caléndula cuando estas disponían de un área foliar grande y a diferentes intensidades de luz y en

hojas de diferentes edades; lo cual es consistente con lo indicado por Guihong y William (2010), quienes destacan la ventaja que tiene una planta en captar y aprovechar recursos para promover aumentos de la tasa de fotosíntesis que inducen mayores ganancias fotosintéticas que satisfacen las demandas energéticas para el mantenimiento de dicha biomasa existente y la síntesis de nuevos tejidos (Gröen, 1973). Sin embargo, tanto el crecimiento de la planta como su capacidad fotosintética son dependientes de la condición nutrimental, ya sea en condiciones de campo o invernadero y de la edad de la hoja (Gröen, 1973). Moreira *et al.*, (2005), han demostrado que la máxima producción de masa en caléndula en condiciones de invernadero, esta relacionada con la nutrición mineral y las concentraciones de nitrógeno en sus tejidos es invertida por la planta en los cloroplastos para ser usados en la fotosíntesis (Guihong y William, 2010; Shokrani y Pirzad, 2012). Posiblemente estos contrastes radican en las condiciones particulares de cada experimento, pero principalmente debido a que la tasa de ganancia de carbono esta en función de la tasa fotosintética, respiración, pérdida de tejidos y la temperatura (Damian *et al.*, 2009; Romero, 2012).

Hoffmann y Komosa (2011), encontraron que a altas tasas de fertilización nitrogenada el número de flores y peso seco aumentan significativamente, caso contrario con la fertilización con nitrato de amonio al 50 y 100% (Figura 1 y 3). Por otro lado, Biesiada y Ku (2010) concluyen que la caléndula no requiere la nutrición de nitrógeno intensiva y establece una dosis óptima de 30 a 50 kg ha<sup>-1</sup>, lo cual queda demostrado en este trabajo, ya que las dosis de nitrato de amonio menores a 100% mostraron el mismo efecto que este, en caléndula.

### **Conclusiones**

El porcentaje de fertilización nitrogenada con *Azolla* 12.5 y 50% , es recomendada para plantas de caléndula, en cambio a concentraciones más altas las plantas se ven afectadas y llegan a morir. La fertilización con nitrato de amonio, resultó ser benéfica para el crecimiento de las plantas de caléndula en todas las concentraciones probadas, pero no para la producción de botones florales. Ambas fertilizaciones en las concentraciones recomendadas, benefician tanto las características morfológicas y fisiológicas de caléndula, apropiadas para desempeñarse satisfactoriamente en condiciones donde la baja disponibilidad de nutrimentos es un factor limitante.

## CAPÍTULO II

### Desarrollo de la raíz de *Calendula officinalis* en sustrato con *Azolla*

#### Resumen

La conformación del sistema radical es un aspecto esencial en las plantas, al permitir la captación de agua y nutrientes en distintos niveles del perfil edáfico. Las macetas tradicionales no permiten evaluaciones morfofisiológicas de la raíz *in situ*, una alternativa es el uso de rizotrones, los cuales, por un lado permiten evaluar la dinámica y crecimiento radical *in situ*. En el presente trabajo se evaluó el uso de rizotrones con dimensiones de 28 cm de ancho, 50 cm de largo y 2 cm de grosor, divididos por una tabla de 3.5 cm de espesor (divisor central). Las paredes laterales 9 x 50 cm (grosor de 7 mm), la base y el divisor central tienen dos rieles, uno donde entra un vidrio de 3 mm, y otro para una tapa de madera de 5 mm de ancho para impedir la entrada de la luz. El diseño permite abrir simultáneamente la cara correspondiente a la parte de enfrente, en donde se pudo observar y realizar la medición de la raíz, a partir de los 10 días después del trasplante (ddt) a los 90 días después del trasplante, con el objetivo de ver la afinidad de la raíz de caléndula hacia la *Azolla*. Se usó 1.2 L por rizotron de *Azolla* seca y molida a diferentes dosis (12.5 y 75%) con sustrato (Agrolite y peat moss, concentración 4:6). Los resultados aportados por el ensayo de afinidad de la raíz establecieron que las características adquiridas por efecto de afinidad hacia *Azolla*, permiten a las plantas desarrollar una raíz principal mas grande, con raíces secundarias y además un mayor número de hojas en plantas de caléndula.

**Palabras clave:** crecimiento radical, rizotron, materia orgánica.

#### Abstract

The formation of the root system is an essential aspect in plants, allowing the uptake of water and nutrients at different levels of the soil profile. Traditional pots morphophysiological not allow the *in situ* evaluations root, an alternative is to use rhizotrons, which on one hand allow the dynamic and root growth *in situ*. In this paper the use of rhizotrons with dimensions of 28 cm wide, 50 cm long and 2 cm thick, divided by a board 3.5 cm thick (central divider) was evaluated. The side walls 9 x 50 cm (thickness of 7 mm), the base and the center divider with two rails, one where a 3mm glass comes in, and one for a wooden lid of 5 mm wide to prevent

the entry of the light. The design allows to simultaneously open the corresponding face to the front, where they could observe and measure the root, from 10 days after transplanting (DAT) at 90 days after transplantation, aiming see affinity marigold root towards Azolla. 1.2 L was used for Rhizotron Azolla dried and ground at different doses (12.5 and 75%) with substrate (Agrolite and peat moss, concentration 4: 6). The results provided by the affinity assay established that root characteristics acquired by Azolla affinity effect, allow the plants to develop a larger main root, secondary roots and also with a larger number of leaves on plants calendula.

**Keywords:** root growth, Rhizotron, organic matter.

## Introducción

La raíz es uno de los órganos más importantes de la planta (Parsons, 1979); su crecimiento y ramificación son cruciales para la absorción de agua y nutrientes. La rizosfera puede ser definida como la zona del suelo que está alrededor de las raíces de las plantas. El crecimiento y salud de las plantas influye en los cambios físicos, químicos y biológicos en la rizosfera. En términos de adquisición de nutrientes, tanto las características estructurales como las funcionales de la raíz han sido reconocidas de ser muy importantes para determinar la capacidad de las plantas para el acceso y disponibilidad de nutrientes esenciales en el suelo y adaptarse a aquellos que son tóxicos. Además las raíces interactúan con diversas poblaciones de microorganismos que están presentes en el suelo, que influyen en el crecimiento y la nutrición. Turner *et al.*, (2013) define rizosfera como la parte del suelo que está directamente influenciada por las raíces y se extiende de 1 a 3 mm desde la superficie de la raíz. Es una zona donde se da toda una serie de relaciones físicas y químicas que afectan a la estructura del suelo y a los organismos que viven en él, proporcionándole propiedades diferentes.

Las plantas modifican las propiedades físicas y químicas así como la composición biológica de la rizosfera a través de una serie de mecanismos, que incluyen la acidificación a través de la extrusión de protones y liberación de exudados de la raíz (Sun *et al.*, 2013).

Es de gran importancia realizar investigaciones a nivel de raíz, ya que son muy pocas en comparación con los estudios que hay sobre la parte aérea. Uno de los grandes problemas en los estudios de raíz es que la mayoría son destructivos, esto limita saber más sobre fisiología, ecología y estructura arquitectónica. Al utilizar bolsas de plástico o macetas, se ignora o no se considera si esto genera un factor de confusión en los resultados de una investigación. El rizotrón es un instrumento que sirve para realizar mediciones y observaciones del sistema radical de las plantas, a través de superficies transparentes. Este tipo de instrumentos son de gran utilidad en el estudio de árboles o de herbáceas. El estudio de las raíces puede involucrar diversos aspectos, ejemplo: nutrición mineral, efecto de estrés salino e hídrico en el crecimiento radical, factores edáficos (pH, fertilización, tipos de sustratos, drenaje, etc.), crecimiento radical de distintas especies, incidencia de plagas y/o enfermedades, distribución de biomasa, interacciones bióticas microorganismos-raíz (micorrizas, bacterias fijadoras de nitrógeno) (Blagodatskaya *et al.*, 2014).

Para determinar si el uso de *Azolla* como abono orgánico tenía efectos nocivos en las raíces de caléndula o la descomposición de la *Azolla* genera compuestos tóxicos que afecten el crecimiento de las raíces, se realizó un estudio en rizotrones para observar el paso de las raíces a través de un sustrato con diferentes proporciones de *Azolla* como abono orgánico.

### **Materiales y métodos**

La temperatura y el fotoperiodo, fueron las variables que se controlaron con promedios de 24°C día y 21°C noche y 12 horas, respectivamente. El invernadero donde se instaló el experimento pertenece al Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Se utilizó plántula de caléndula, variedad calipso-flor naranja (del invernadero “Plántulas de Tetela”, Morelos), con 15 días de germinación en semilleros (con Agrolite y peat moss, relación 2:3), se les adicionó agua estéril y se incubaron a temperatura ambiente hasta el día del trasplante.

Se utilizaron dos rizotrones de madera y vidrios deslizables que permitieron hacer las observaciones del sistema radical. Constó de dos compartimentos, cada uno de ellos con dimensiones de: 28 cm de ancho, 50 cm de largo y 2 cm de grosor tanto en la parte superior (que estaba descubierta) como en la parte de inferior, divididos por una tabla de 3.5 cm de espesor (divisor central). Se utilizó una tabla de 3 mm para el respaldo. Las paredes laterales 9 x 50 cm (grosor de 7 mm), la base y el divisor central tienen dos rieles, uno donde entra un vidrio de 3 mm, y otro para una tapa de madera de 5 mm de ancho para impedir la entrada de la luz. La base de 9 x 61 cm, con perforaciones cada 4 cm para drenar el agua. Se cubrió con tabletas de poliestireno (unicel) que es inerte. Se encontraban impermeabilizados con parafina para evitar filtraciones dentro del sistema (Figura 1). Se calculó el volumen de cada uno de los rizotrones, registrándose 1.2 L de sustrato (Agrolite y peat moss, concentración 4:6) previamente esterilizado en húmedo a 121 °C. Posteriormente, en cada rizotrón se trasplanta a 5 cm de profundidad cuatro plántulas de caléndula (dos por cada división), para ello se dividió el rizotrón en dos partes (18 y 10 cm) con ayuda de un palillo de madera de 1 cm de grosor, para colocar en cada una de las partes las concentraciones de *Azolla* a 12.5% y 75% en combinación con el sustrato y el testigo absoluto (0% *Azolla*) (Figura 1). Los rizotrones se colocaron dentro de un invernadero de cristal a una temperatura de 21 °C promedio y humedad relativa de 24%. El

seguimiento de las condiciones de invernadero a lo largo del experimento se hizo con una mini estación Hobo 2CHNL (Thomas scientific ®).

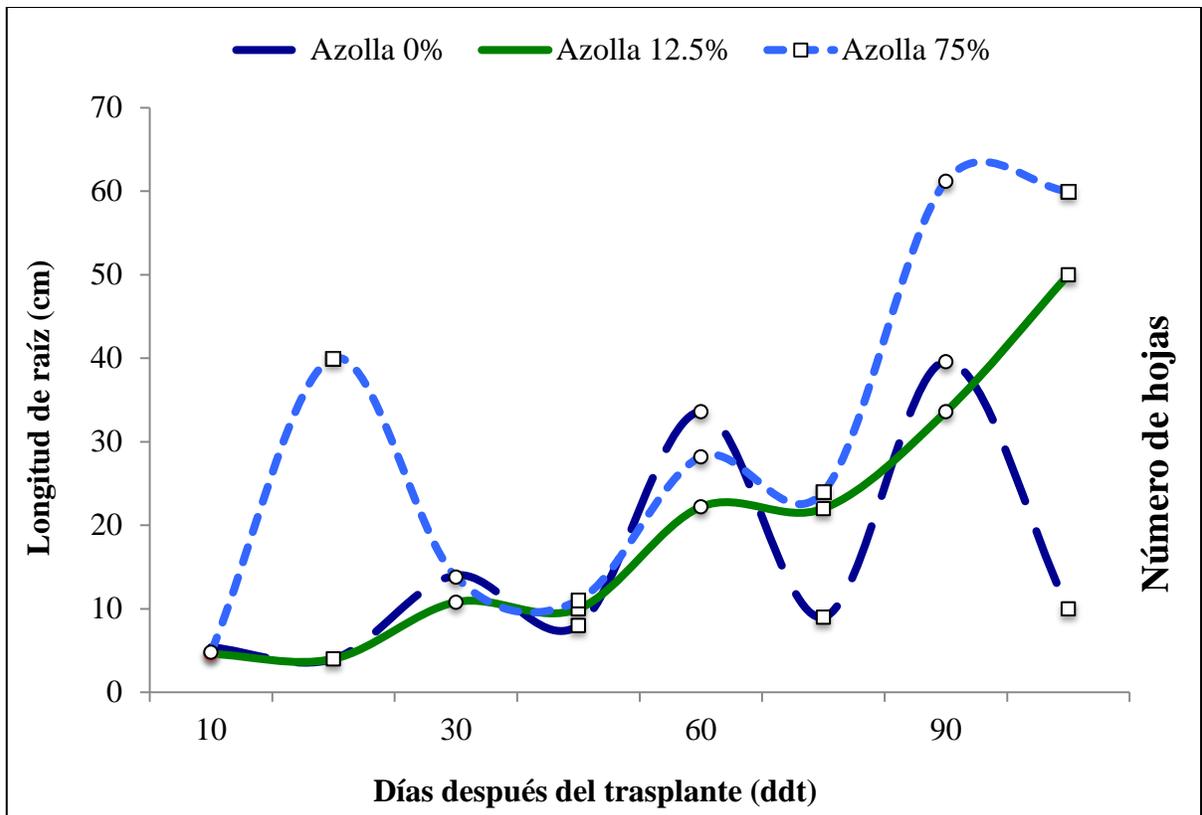


**Figura 1.** Rizotrón de madera empleado en el experimento para observación del sistema radical. (A) parte frontal y (B) posterior del rizotrón.

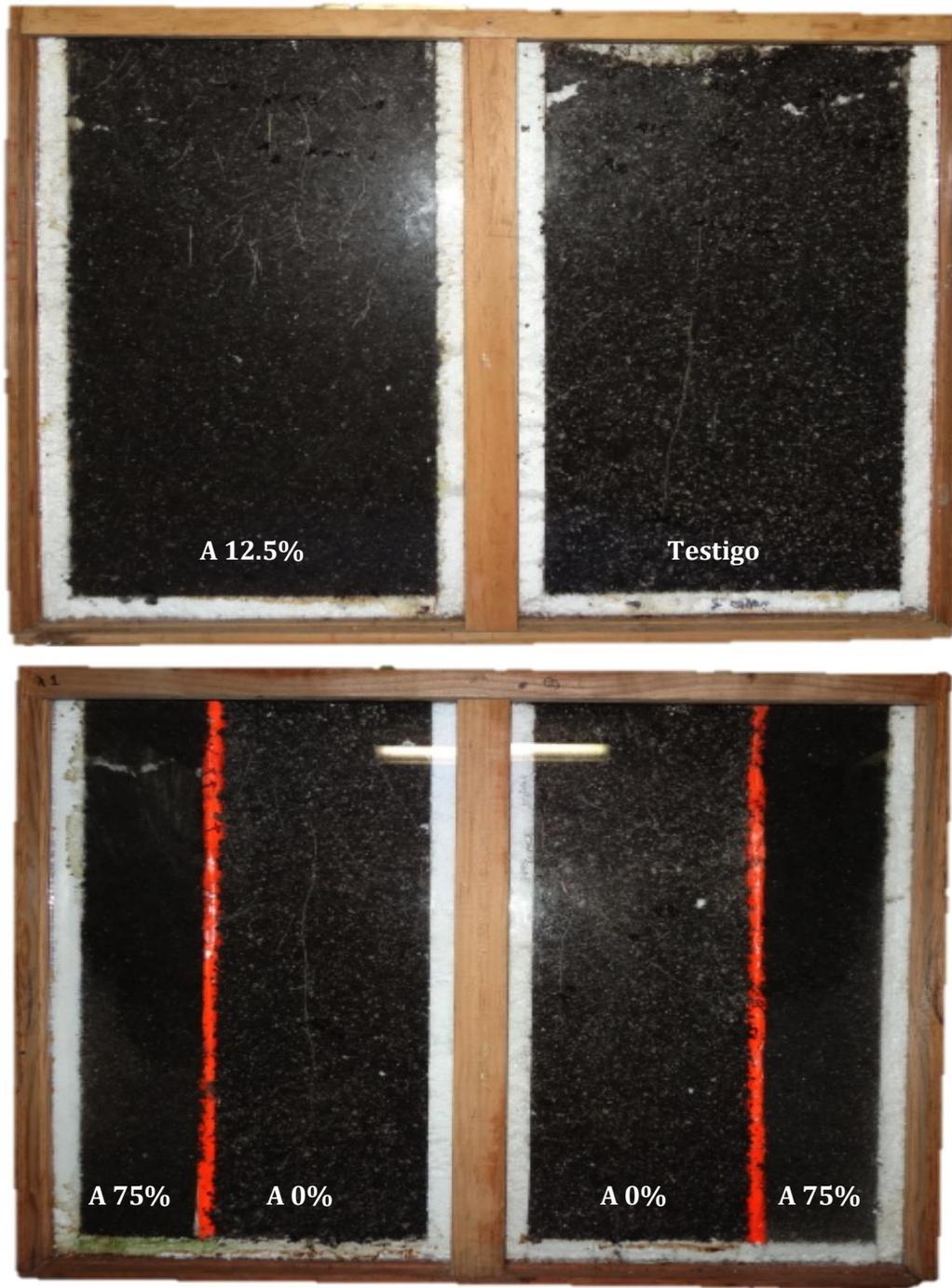
## Resultados

### Crecimiento de la raíz de caléndula

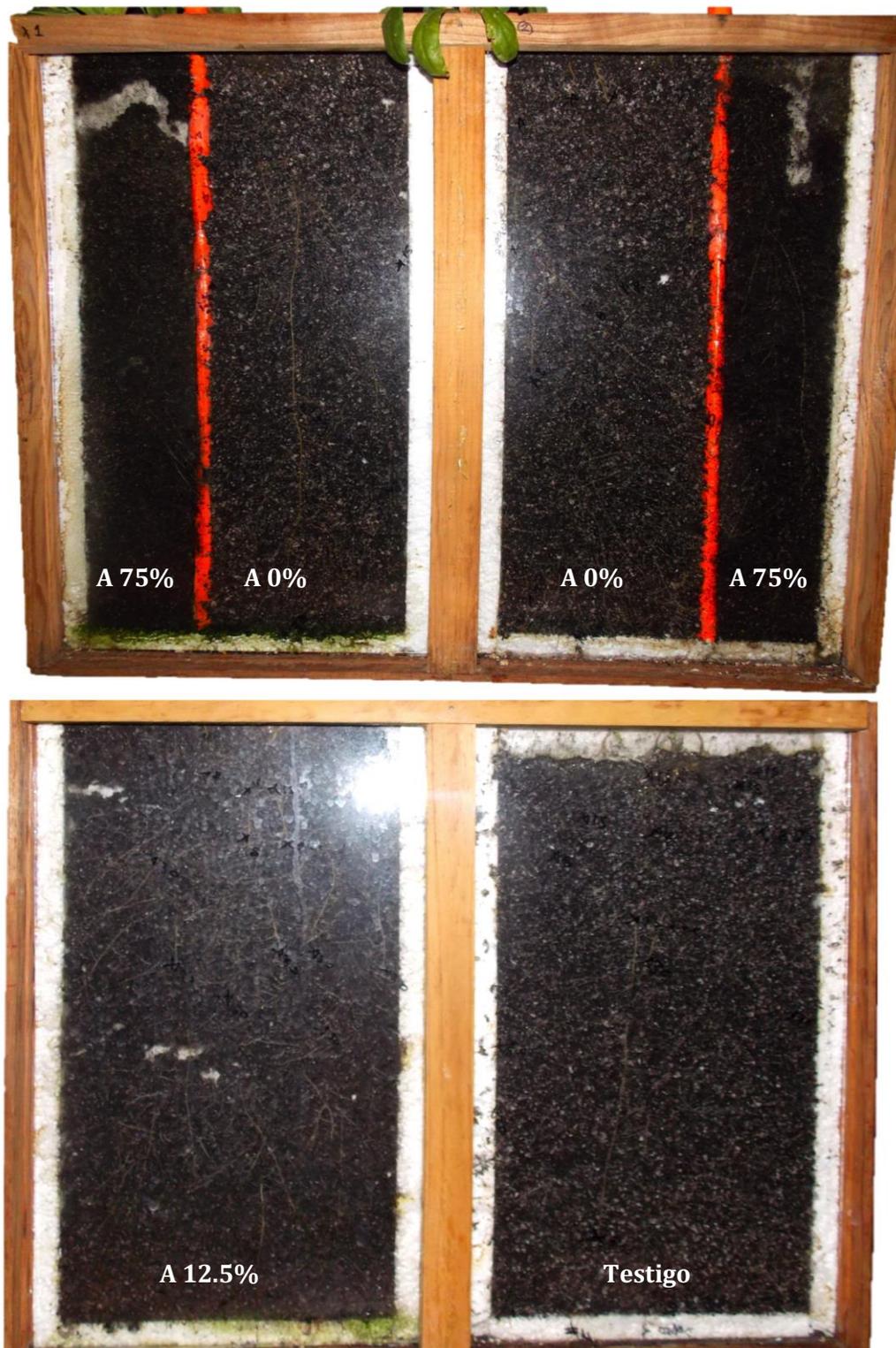
Las plantas de caléndula trasplantadas en los rizotrones se evaluaron hasta los 90 días después del trasplante (ddt), para ello se midió con ayuda de una cinta métrica, cada 30 días el crecimiento radical y la orientación de las raíces hacia la parte donde se encontraba el sustrato más la *Azolla* (Figuras 3-5), y número de hojas. El crecimiento en longitud de raíz principal en *Azolla* 75% alcanzó 15.2 cm desde el trasplante a los 30 ddt, 28.4 cm a los 60 ddt y 60 cm a los 90 ddt, en las condiciones de ensayo (Figura 2), las raíces laterales se desarrollaron mas lentamente; en cuanto a número de hojas se encontró 11 hojas a los 30 ddt, 24 hojas a los 60 ddt y 60 hojas a los 90 ddt en promedio por planta (Figura 2). Para *Azolla* 12.5% se encontró un crecimiento de 10.8 cm de longitud para raíz a los 30 ddt, 22.2 cm a los 60 ddt y 33.6 cm de longitud en raíz a los 90 ddt (Figura 2); el número de hojas para este caso fue de 10 hojas en promedio por planta a los 30 ddt, 22 hojas a los 60 ddt y 50 hojas a los 90 ddt, en promedio (Figura 2). En estos dos casos (*Azolla* 12.5 y 75%) el número de hojas fue similar a la longitud radical, ambos fueron en aumento a partir de los 30 días del trasplante y la raíz se dirigió a la parte donde se encontraba la *Azolla* con el sustrato. En comparación con *Azolla* 0%, solo presentó 14 cm de longitud en raíz a los 30 ddt, 33.6 cm a los 60 ddt y 39.6 cm a los 90 ddt, en promedio por planta; 8 hojas en promedio por planta a los 30 ddt, 9 hojas a los 60 ddt y 10 hojas a los 90 ddt, por planta (Figura 2), en este caso la raíz principal creció en un solo sentido, sin presentar varias raíces secundarias.



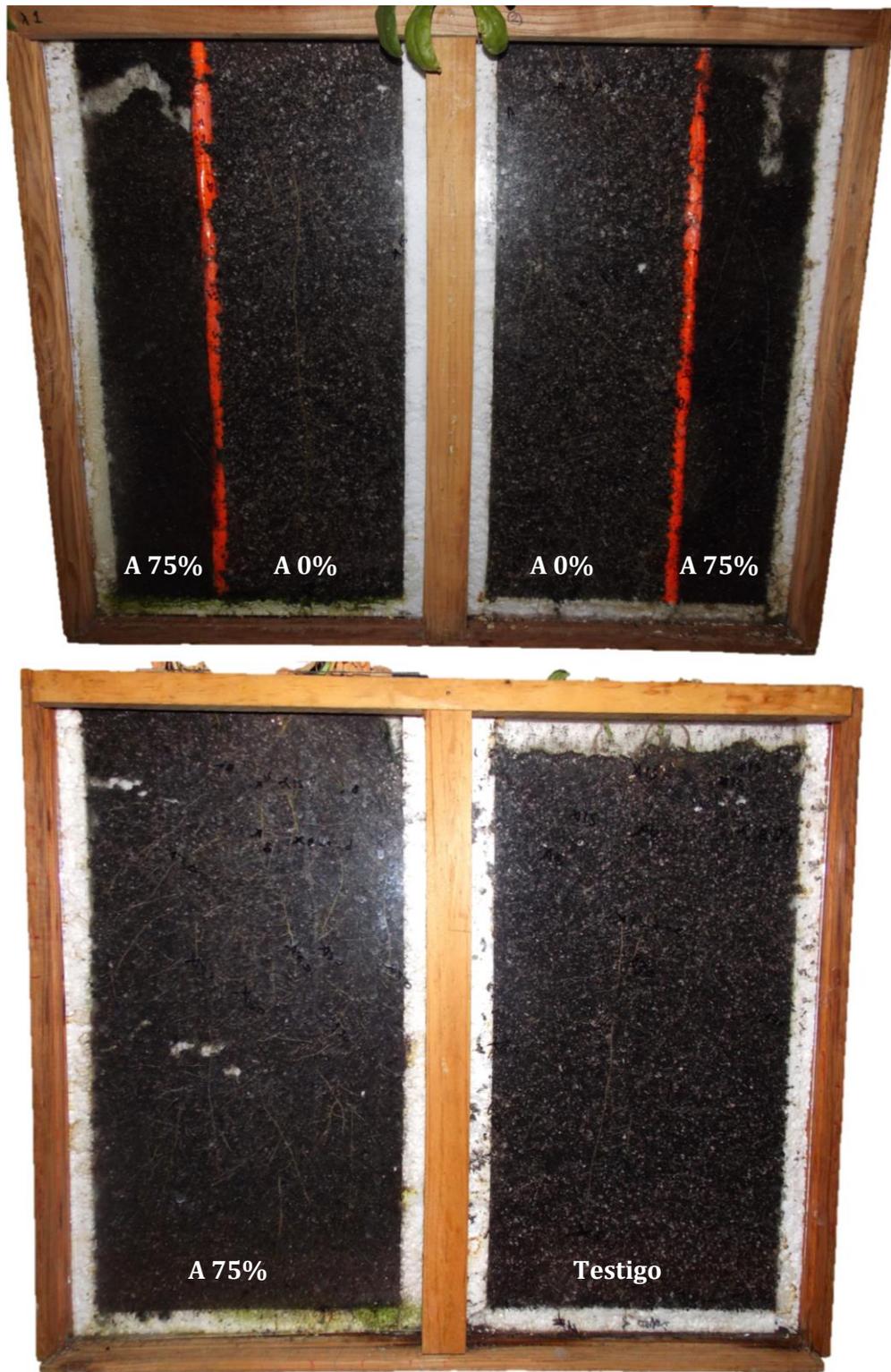
**Figura 2.** Longitud de la raíz y número de hojas de caléndula en un sustrato con aplicación de *Azolla* a 12.5 y 75%, a los 10, 30, 60 y 90 ddt. Simbología: círculos blancos (longitud radical) y cuadros blancos (número de hojas).



**Figura 3.** Efecto de *Azolla* en raíces de caléndula, a los 30 días después del trasplante.



**Figura 4.** Efecto de *Azolla* en raíces de caléndula, a los 60 días después del trasplante.



**Figura 5.** Efecto de *Azolla* en raíces de caléndula, a los 90 días después del trasplante.

## **Discusión**

Los resultados confirman el destacado desarrollo de la raíz de caléndula en *Azolla* 75% y 12.5%, probablemente como resultado del aporte de nitrógeno que tiene *Azolla* en combinación con el sustrato y el alto contenido de materia orgánica, lo que favorece una mayor retención de agua, de modo que la planta tuvo una mayor disponibilidad de agua; también se obtuvo mayor número de hojas, ya que favorece la acumulación de fotosintatos en la parte aérea de la planta (Hoyos, 2000).

El uso de rizotrones en plantas de caléndula no está documentado aún, pero se tienen reportes del uso de *Azolla* como fertilizante orgánico en otros cultivos (por ejemplo, hortalizas) y arroz para mejorar los sustratos (Van-hove, (1989), Bharati *et al.*, (2000), Arora y Singh (2003) y Castro *et al.*, (2009).

## **Conclusiones**

La incorporación de *Azolla* (12.5 y 75%) incrementaron el número de hojas y longitud radical de caléndula, según lo observado a través de los rizotrones. La longitud radical fue incrementando a partir de los 30 ddt, respecto a *Azolla* 0%. El uso de los rizotrones nos mostró que el uso de *Azolla*, no causa toxicidad en las plantas de caléndula a una concentración de 75% pero a cierta distancia de la raíz de la planta. Caso contrario sucedió en el experimento donde se usó directamente en la raíz de caléndula; por lo contrario, a cierta distancia mejora el número de hojas y sistema radical, probablemente debido a ciertas sustancias liberadas lentamente por la degradación de *Azolla* que atraen a las raíces.

## CAPÍTULO III

### **Efecto de la inoculación con hongo micorrízico arbuscular (HMA) y de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) en el contenido de carotenoides de *C. officinalis* con aplicación de *Azolla* o nitrato de amonio**

#### **Resumen**

*Calendula officinalis* L. es una planta herbácea anual de la familia Asteraceae, originaria del mediterráneo. El color de sus flores va de amarillo a anaranjado, según la variedad. Dicho color se origina a partir de varios pigmentos, entre ellos los carotenoides. También se ha demostrado diversidad varietal en su composición química. Sin embargo, no se ha investigado el efecto del manejo agronómico, como es la fertilización nitrogenada con *Azolla*, la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) y hongo micorrízico arbuscular (HMA), en el crecimiento y contenido de estos pigmentos. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de carotenoides totales en capítulos florales, crecimiento y desarrollo de caléndula, variedad Calipso (flor naranja-amarilla) fertilizada con *Azolla* (seca y molida) y nitrato de amonio a diferentes dosis (12.5 y 25%) e inoculada con BPCV (consorcio) y HMA (*Rhizophagus intraradices*), los capítulos florales fueron cosechados a lo largo de dos cortes sucesivos, se cosecho y evaluó colonización micorrízica a los 152 días después del trasplante (ddt). La extracción de carotenoides totales se basó en el método de determinación de clorofilas A, B, C y carotenoides totales por espectrofotometría. La fertilización con *Azolla* 12.5% por si solo y en combinación con BPCV y HMA mostró efectos significativos para diferentes variables (número de hojas, área foliar, peso seco, número de botones y flores) y carotenos totales en ambos cortes. En cambio la fertilización con nitrato de amonio 25% en combinación con BPCV y HMA o por si solo, tuvo efectos benéficos en las mismas variables evaluadas, pero no en el contenido de carotenoides (ya que no hubo presencia de botones florales). El porcentaje de colonización micorrízica total fue de 78% en HMA, de 43% en raíces inoculadas con HMA+*Azolla* y 63% en las raíces inoculadas con HMA y nitrato de amonio.

**Palabras clave:** botón de oro, carotenoides, caléndula, nitrógeno.

## ABSTRACT

*Calendula officinalis* L. is an annual herbaceous plant of the Asteraceae family, native to the Mediterranean. The color of the flowers is yellow to orange, being a coded variety. Said color originates from various pigments, including the carotenoids. It has also been demonstrated varietal diversity in their chemical composition. However, it has not investigated the effect of agricultural practices, such as Azolla nitrogen fertilization, inoculation with plant growth promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the growth and content of these pigments. The aim of this study was to determine the concentration of total carotenoids in flower heads, growth and development of calendula, variety Calypso (orange-yellow flower) fertilized with Azolla (dried and ground) and ammonium nitrate at different doses (12.5 and 25% ) and inoculated with PGPR (consortium) and HMA (*Rhizophagus intraradices*), the flower heads were harvested along two successive cuts, was harvested and evaluated micorrízica colonization to 152 days after transplanting (DAT). Extraction of total carotenoids was based on the method of determining chlorophyll A, B, C and total carotenoids by spectrophotometry. Fertilization 12.5% Azolla alone and in combination with PGPR and AMF showed significant effects for different variables (number of leaves, leaf area, dry weight, number of buds and flowers) and total carotenoids in both courts. Instead fertilization ammonium nitrate 25% and in combination with PGPR alone or HMA, had beneficial effects on the same variables tested, but not in the carotenoid content (as no presence of flower buds). The total mycorrhizal colonization percentage was 78% in HMA, 43% in roots inoculated with HMA + Azolla and 63% in roots inoculated with HMA and ammonium nitrate.

**Keywords:** *Calendula officinalis*, carotenoids, fertilization, nitrogen.

## Introducción

La producción comercial en los agroecosistemas está asociada a la nutrición mineral de las plantas a través de fertilizantes orgánicos y de síntesis, y el conocimiento del aporte de nutrimentos que hace el suelo y sus demandas en los procesos fisiológicos de la planta, permite formular y proveer una adecuada fertilización y garantizar su productividad, ya que nutricionalmente, los macro y micronutrientes contribuyen al crecimiento y desarrollo en la fase vegetativa y productiva de la planta, promoviendo indirectamente su crecimiento, sanidad y metabolismo (Benton, 1998; Rao, 2009).

El ofrecer un programa o producto de fertilización adecuado de origen industrial u orgánico, no solo garantiza mayor rentabilidad del agroecosistema y, por ende mayores beneficios financieros y económicos-sociales para el productor, sino que minimiza el impacto ambiental por contaminación de aguas, aire, suelos, animales y personas (Valencia, 1999; Cenicafe, 2007). Esto contribuye a crear fertilizantes orgánicos eficientes basados en microorganismos alcanzando gradualmente la sostenibilidad de los sistemas en contexto, por ejemplo: bacterias promotoras de crecimiento vegetal, solubilizadoras de fosfatos, fijadoras de nitrógeno, productoras de sideróforos y hongos micorrízicos arbusculares; usados ya en cultivos hortícolas por sus múltiples beneficios en las plantas (estimulan crecimiento, resistencia a patógenos e influyen en el contenido de metabolitos secundarios) (Gianinazzi *et al.*, 2010; Raviv, 2010; Soundarapandian y Dhandayuthapani, 2010; Vestberg *et al.*, 2011). Otra alternativa que se ha venido usando desde hace mucho tiempo como fertilizante nitrogenado orgánico es *Azolla* junto con su simbionte fijador de nitrógeno, ha sido utilizada en cultivos de arroz y actualmente trasladada en cultivos de pepino y lechuga, en donde se ha observado su potencial en el control de plagas y como fertilizante orgánico (Bharati *et al.*, 2000; Arora y Singh, 2003; Castro *et al.*, 2009). Para llegar a tal punto, debe existir un balance armónico entre las pérdidas y aportes de nutrientes que requieren las plantas. Alarcón (2001) confirma que la fertilidad del suelo se mantiene cuando las exportaciones son compensadas por las aportaciones. El estudio de la dinámica nutricional a través de la relación suelo-planta-ambiente constituye el punto de partida para lograr un manejo eficiente de nutrientes y responder a las necesidades de los cultivos (SCCS, 2010).

Las plantas medicinales no son la excepción, desconocer sus requerimientos nutricionales implica no saber si se esta sub o sobre-dosificando y, por ende, limitar el

potencial productivo, causar graves pérdidas económicas-sociales para el productor e incrementar la contaminación ambiental. En México, el desafío es grande, ya que existe muy poca información concerniente a la nutrición mineral de las plantas medicinales en sus diversas localidades y etapas fenológicas; con gran demanda para fines culinarios, aromáticos, estéticos y medicinales.

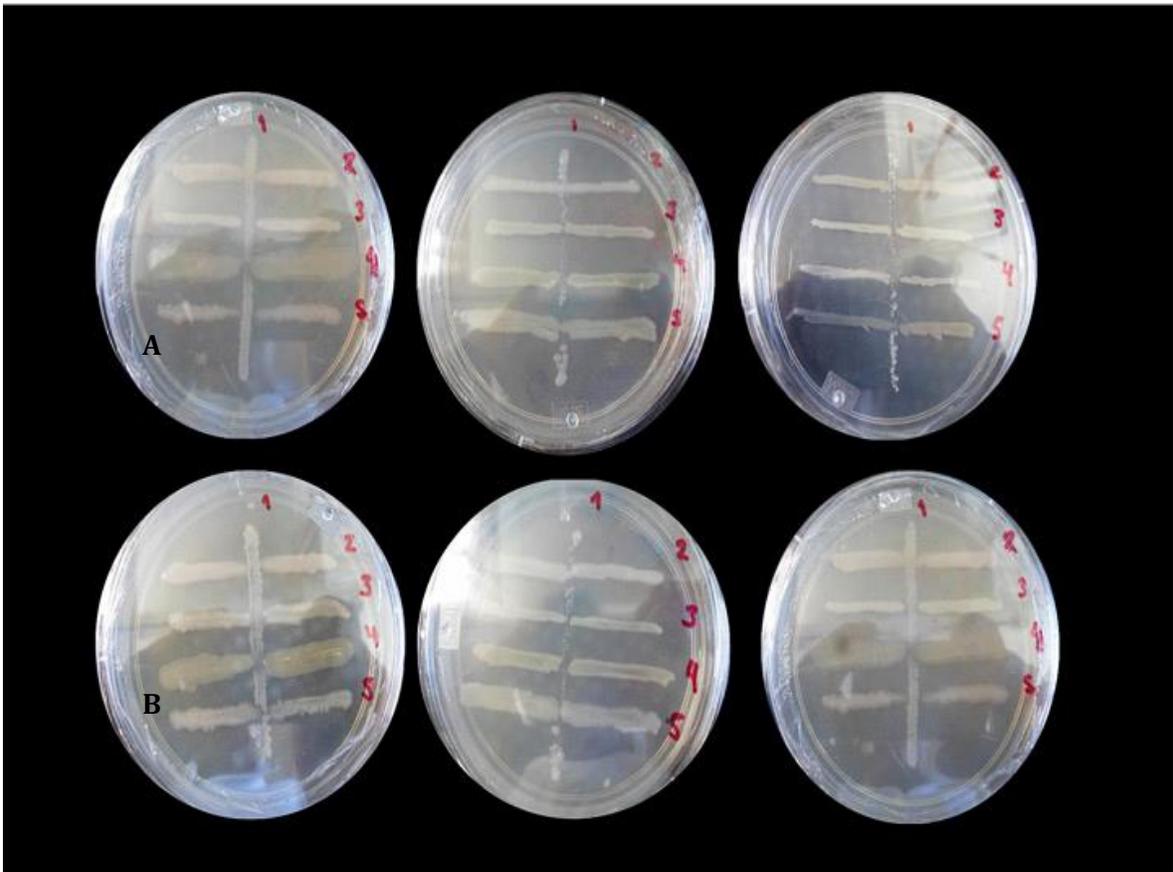
Si bien, la mayor información disponible acerca de microorganismos promotores de crecimiento vegetal se encuentra a nivel de laboratorio e información acerca de *Azolla* como fertilizante se encuentra en cultivos de arroz y como alimento para porcinos, en el presente trabajo se aporta información sobre las demandas nutricionales de nitrógeno de la caléndula en condiciones de invernadero; usando como fuente nitrogenada el nitrato de amonio, *Azolla* (seca y molida), bacterias promotoras de crecimiento vegetal y un hongo micorrízico arbuscular (*Rhizophagus intraradices*).

## **Materiales y métodos**

Las fases experimentales involucradas en este estudio, se realizaron en condiciones controladas de invernadero y laboratorio. El invernadero donde se instaló el experimento pertenece al Postgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Texcoco, Edo. de México. La temperatura y el fotoperiodo, fueron las variables que se controlaron con promedios de 24°C día y 21°C noche y 12 horas, respectivamente. El laboratorio donde se evaluó carotenoides totales y la confrontación de cepas bacterianas pertenece al Área de Microbiología, en Colegio de Postgraduados, Edo. de México.

### **Selección y confrontación de cinco cepas bacterianas**

En medio de cultivo PDA y Agar nutritivo sólido (anexo 1) se reactivaron cinco cepas bacterianas promotoras de crecimiento vegetal (Cuadro 1), pertenecientes al cepario del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados, aisladas de diferentes condiciones (P61, BSP1.1 y A46 de suelo agrícola y Ols-Sf5 aislada de esporoma de hongo ectomicorrízico *Lactarius salmonicolor*). Las bacterias fueron sembradas en cajas de Petri de 9 x 8.5 x 1.5 cm, con los medios PDA y agar nutritivo sólido, por el método de estria cruzada, y fueron incubadas a 28°C durante tres días. Después de los tres días, estas bacterias se sembraron en cajas de Petri con medio agar nutritivo y PDA, formando líneas rectas de 4 cm (una cepa por línea) con el asa bacteriológica y fueron incubadas a 28°C durante tres días, confrontándose entre ellas (Figura 1) para la formación de un consorcio bacteriano entre las que no se evidenciara inhibición.



**Figura 1.** Confrontación de las cinco cepas bacterianas en medio PDA (A) y agar nutritivo (B). 1= P61; 2= Ols-Sf5; 3=BSP 1.1; 4=A46; 5= R44.

**Cuadro 1.** Características fisiológicas y origen de las cinco cepas bacterianas utilizadas en el experimento.

Clave de la cepa	Identificación taxonómica	Solubilizadora de fósforo	Productoras de indoles	Fijadoras de nitrógeno	Lugar de aislamiento
<b>P61</b>	<i>Pseudomona tolaasii</i>	+++	+++	+++	Suelo agrícola
<b>Ols-Sf5</b>	<i>Pseudomona</i> sp.	++	++	++	Esporoma de <i>Lactarius salmonicolor</i>
<b>BSP 1.1</b>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	+	-	+++	Suelo agrícola
<b>A46</b>	<i>P. tolaasii</i>	+++	++	+++	Suelo agrícola
<b>R44</b>	<i>Bacillus pumilis</i>	+++	++	+	Suelo agrícola

Simbología: (-)= nula; (+)= baja; (++)= media; (+++)= alta.

### Conteo de esporas de *Rhizophagus intraradices*

Para saber la viabilidad del inóculo micorrízico (*Rhizophagus intraradices*) se realizó muestreo del suelo (método, Gonzalez y Barrios, 1983), tamizado en húmedo-decantación y conteo de esporas (Gerdemann y Nicolson, 1963). El muestreo es para determinar la población de esporas en el inóculo. Para ello, se tomó muestra de rizosfera de la planta (cultivo trampa de Vaporub, perteneciente al Área de Microbiología) y dichas muestras se conservaron en refrigeración a una temperatura de 10°C hasta su procesamiento. Se utilizó el método de tamizado y decantación en húmedo para extraer las esporas del suelo, que se basa en el diámetro y densidad de las esporas; para ello se pesaron 20 g de la muestra de suelo colectado y se pasó a un recipiente con un L de agua, se agitó con ayuda de una varilla de vidrio durante cinco minutos, se dejó reposar tres minutos y se procedió a tamizar (tamices de 30, 200, 325

µm), lo colectado en los tamices de 325 y 200 µm se colocaron por separado en frascos de plástico con ayuda de una pizeta con agua destilada, este procedimiento se repitió dos veces más. Una vez separadas las esporas se realizó un análisis cuantitativo para determinar el número de esporas en gramos de suelo seco; para lo cual, se usó un papel filtro cuadrículado, que se colocó bajo la caja de Petri de 9 x 8.5 x 1.5 cm, con la suspensión tamizada y con ayuda de un estereoscopio (marca Leica modelo EZ4D) se contó y se obtuvo el número de esporas. El resultado se da en número de esporas por 100 g de suelo seco según la fórmula del Cuadro 2. En este caso se usaron 20 g de suelo. En base a esto, se determinaron los gramos de inóculo micorrízico por planta (5 g por planta).

**Cuadro 2.** Determinación del número de esporas en suelo rizosférico.

---


$$\text{Número de esporas en 100g de suelo seco} = \frac{(\text{Número de esporas contadas})}{(\text{g de suelo seco})} \times 100$$

$$100 \text{ g de suelo humedo}$$


---

### **Producción de planta**

Se utilizó plántulas de *Calendula officinalis*, variedad calipso-flor naranja-amarilla (del invernadero “Plantulas de Tetetla”, Morelos), con 15 días de germinación en semilleros (con agrolita y peat moss), se les adicionó agua estéril y se incubaron a temperatura ambiente hasta el día del trasplante.

### **Preparación de inóculo bacteriano (consorcio)**

Cuatro días antes del trasplante, se sembraron individualmente las cinco cepas bacterianas seleccionadas de la fase anterior (confrontación: A46, P61, Ols-Sf5, A46 y R44), en 30 mL de caldo nutritivo y se incubaron a 28°C durante tres días. Pasados los tres días, se procedió a preparar el inóculo, vaciando los 30 mL de medio con su respectiva bacteria en tubos Falcon estériles de 50 mL, para cetrifugar (Sigma ®) a 5000 rpm durante 10 minutos. Después de esto, se desechó el sobrenadante, se colocaron 50 mL de agua destilada esteril y se volvió a centrifugar (se repitió este procedimiento una vez más). Después de la última

centrifugación se desechó el sobrenadante y quedó únicamente el pellet bacteriano en el fondo del tubo. Se agregaron 50 mL de agua destilada estéril para obtener una suspensión de bacterias, posteriormente se tomó de cada tubo Falcon (con su respectiva bacteria) 10 mL de inóculo bacteriano y se colocaron en un solo tubo para después agitar con ayuda de un vórtex (K-MS1, Minishaker). El consorcio bacteriano se guardó a 4°C hasta el momento de aplicarlas a las plántulas de caléndula. Se utilizaron 5 mL inóculo bacteriano por planta.

### Diseño experimental y tratamientos aplicados

Con base en criterios obtenidos de la fase anterior (número de hojas y etapa temprana de floración), se determinaron los porcentajes de fertilización con *Azolla* y nitrato de amonio (12.5% para el primero y 25% para nitrato).

Quince días después de la germinación de las semillas de caléndula, se procedió al trasplante de estas a macetas de 60 g de capacidad, las cuales se llenaron con Agrolite y Peat moss a una relación (4:6), previamente esterilizados en húmedo a 121°C durante tres horas por tres días.

El experimento consistió, en seis combinaciones de tratamientos con 15 repeticiones resultantes de un arreglo factorial 6X2, se asignaron a cada uno de los tratamientos un diseño completamente al azar. El primer factor involucrado fue el nivel de fertilización nitrogenada [nitrato de amonio 25% ( $0.32 \text{ g L}^{-1}$ ) y *Azolla* 12.5% (7.5 g)].

El tratamiento de nitrato de amonio 25% se aplicó cada ocho días en un litro de solución nutritiva Jensen (5 mL por planta), durante todo el experimento, (4 meses). El de *Azolla* 12.5% consistió en la combinación del sustrato más la *Azolla* seca (fue secada a 70°C por tres días consecutivos en estufa Jouan Quality System) y molida (a mano) (Cuadro 3 ). Los cálculos se basaron en la siguiente regla de tres:

$$\begin{array}{l} 100\% = 60\text{g (sustrato)} \\ \swarrow \quad \searrow \\ 25\% (\text{Azolla}) = ? \end{array}$$

X= 45g de sustrato y 15g de *Azolla* por maceta (70% *Azolla*)

**Cuadro 3.** Tratamientos con *Azolla* (porcentaje y gramos por maceta).

<b>Porcentaje</b>	<b>Gramos por maceta</b>
25%	15g
12.5%	7.5g

Los fertilizantes aplicados fueron la única fuente de nutrientes pues en los riegos se utilizó agua destilada. Posteriormente, después del trasplante las macetas permanecieron bajo condiciones de invernadero a 21 y 24 °C, 24% de humedad relativa y con un fotoperiodo de 12 horas; durante 152 días después del trasplante (ddt).

#### **Evaluación de las variables después de 152 días del trasplante (ddt)**

A la finalización del experimento (152 ddt) se evaluaron: número de hojas, de flores y botones florales, volumen radical, área foliar, peso seco (raíz, hoja, botón, flor), SPAD, clorofila y colonización micorrizica en raíces.

La clorofila, se evaluó con medidor de estrés de la planta (Opti-Sciences) y unidades SPAD con MCL502 (Minolta SPAD 502 plus, modelo estándar). Las mediciones se hicieron en cinco plantas de cada tratamiento en las cuales se tomó la doceava o la treceava hoja de cada planta. Además se hizo el conteo de hojas de cada planta.

Posteriormente, todas las plantas fueron cosechadas, para separar la parte aérea de la parte radical. Una vez separadas las hojas se procedió a medir el área foliar mediante un integrador de área foliar (LI-COR modelo LI-3100) y se colocaron en bolsa de papel para secarlas a 70 °C, durante 48 h y con ello, registrar su peso seco. Por su parte las flores fueron pesadas y colocadas en bolsas de papel para secarlas en una estufa (Shel-Lab) a una temperatura de 50 °C por 48 h para después registrara su peso seco y ser utilizadas en la extracción de carotenoides, y las raíces fueron lavadas y secadas con papel absorbente para posteriormente medir el volumen radical mediante el método de desplazamiento de volumen de agua en probeta (cm<sup>3</sup>).

Después, se tomaron cinco raíces de las plantas inoculadas con *Glomus intraradices* para someterlas a un proceso de clareo y tinción para determinar el porcentaje de colonización micorrízica (Phillips y Hayman, 1970). Para tal fin, las raíces se cubrieron sucesivamente con

una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10% (Anexo 6.2.a), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 10% (Anexo 6.2.b), ácido clorhídrico (HCl) al 10% (Anexo 6.2.c), y finalmente, con una solución de azul tripano al 0.05% en lactoglicerol. El procedimiento fue el siguiente, las raíces una vez libres de suelo, se colocaron en tubos Falcon estériles, a los cuales se les agregó suficiente KOH al 10% para cubrirlas, y se procedió a calentar por 10 minutos a 115 °C (10 libras de presión). Después el KOH se decantó para enjuagar las raíces con agua destilada, e inmediatamente se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% en suficiente cantidad para cubrir las raíces durante cinco minutos; pasado este tiempo se enjuagaron con agua destilada. Después, las raíces se cubrieron con HCl al 10% por cinco minutos; se eliminó el ácido y sin enjuagar las raíces se procedió a su tinción. Las raíces se cubrieron con la solución colorante [(azul tripano 0.05% (Anexo 6.2.d) en lactoglicerol)], y permanecieron en reposo durante tres días. El colorante se eliminó, y se decoloraron las raíces con lactoglicerol limpio y con agua corriente de la llave.

Para determinar el porcentaje de colonización micorrizica, las raíces en fragmentos de 1.5 cm se montaron en portaobjetos con una gota de lactoglicerol (Anexo 6.2.e). En cada portaobjetos se colocaron 20 fragmentos de raíz, paralelamente unos a otros. Sobre las raíces ya montadas, se adicionó una gota de lactoglicerol para colocar los cubre objetos.

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental bloques completos al azar con arreglo factorial 6 x 2, con 10 repeticiones. La comparación de medias se hizo mediante la prueba de LSD ( $\alpha= 0.05$ ). Los análisis estadísticos se hicieron con los paquetes SAS (SAS Institute, 2002).

### **Determinación de carotenoides**

La cosecha de los capítulos (flores) fue en forma manual y en cortes periódicos (cada 6 a 8 días), cuando se alcanzaba la plena floración con flores tubulares y liguladas maduras. Se hicieron 3 cortes (cosechas) en total, que iniciaron a los 60 días después del trasplante.

Los capítulos recolectados fueron secados en estufa (Shel-Lab) a 50 °C por 48 h, pesados en una balanza analítica y molidos a mano para su posterior análisis químico en laboratorio.

La técnica de extracción de carotenoides totales, se realizó con el método de determinación de clorofilas A, B, C y carotenoides totales por espectrofotometría (Strickland y Parsons, 1972; Britton, 1985). De cada muestra se peso 0.2008 g de material vegetal de

capítulos secos de caléndula, una vez pesado el material se colocó en tubos de ensayo con tapa rosca (18 mm x 180 mm) y cubiertos con papel aluminio, se agregaron 10 mL de acetona al 90% (Anexo 6.2.f), el extracto se dejó reposar por 24 h en refrigerador a una temperatura de 4 °C. Después de 24 h se tomó de cada muestra (incluido el testigo ó blanco) 300 µL con ayuda de una micro pipeta y fueron colocados en una placa multipocillos de poliestireno y en seguida se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Power Wave XS, Biotek) a 480 y 750 nm; posteriormente se sustituyeron los valores de absorbancia en la siguiente ecuación (Strickland y Parsons, 1972; Britton, 1985):

Carotenoides totales (g/L) =  $(A_{480} - A_{750}) * \text{vol. extracto (en mL)} / [(100 * E_{1\text{cm}}^{1\%}) * (\text{vol filtrado en L})]$ .

Para obtener los datos de producción de carotenoides totales (PCT, en kg ha<sup>-1</sup>), se uso la siguiente ecuación:

$$\text{PCT} = \frac{(\text{concentración de carotenoides totales, mg g}^{-1} \text{ M.S}) (\text{biomasa de capítulos secos, kg ha}^{-1})}{1000}$$

Los datos obtenidos de concentración de carotenoides totales (mg g<sup>-1</sup> MS) y de producción de carotenoides totales (kg ha<sup>-1</sup>) se sometieron a análisis de varianza conforme a un diseño experimental de bloques completos al azar con arreglo factorial 6 x 2 con 10 repeticiones. La comparación de medias de carotenoides totales se hizo mediante la prueba de LSD ( $\alpha= 0.05$ ). Los análisis estadísticos se hicieron con los paquetes SAS (SAS Institute, 2002).

## Resultados

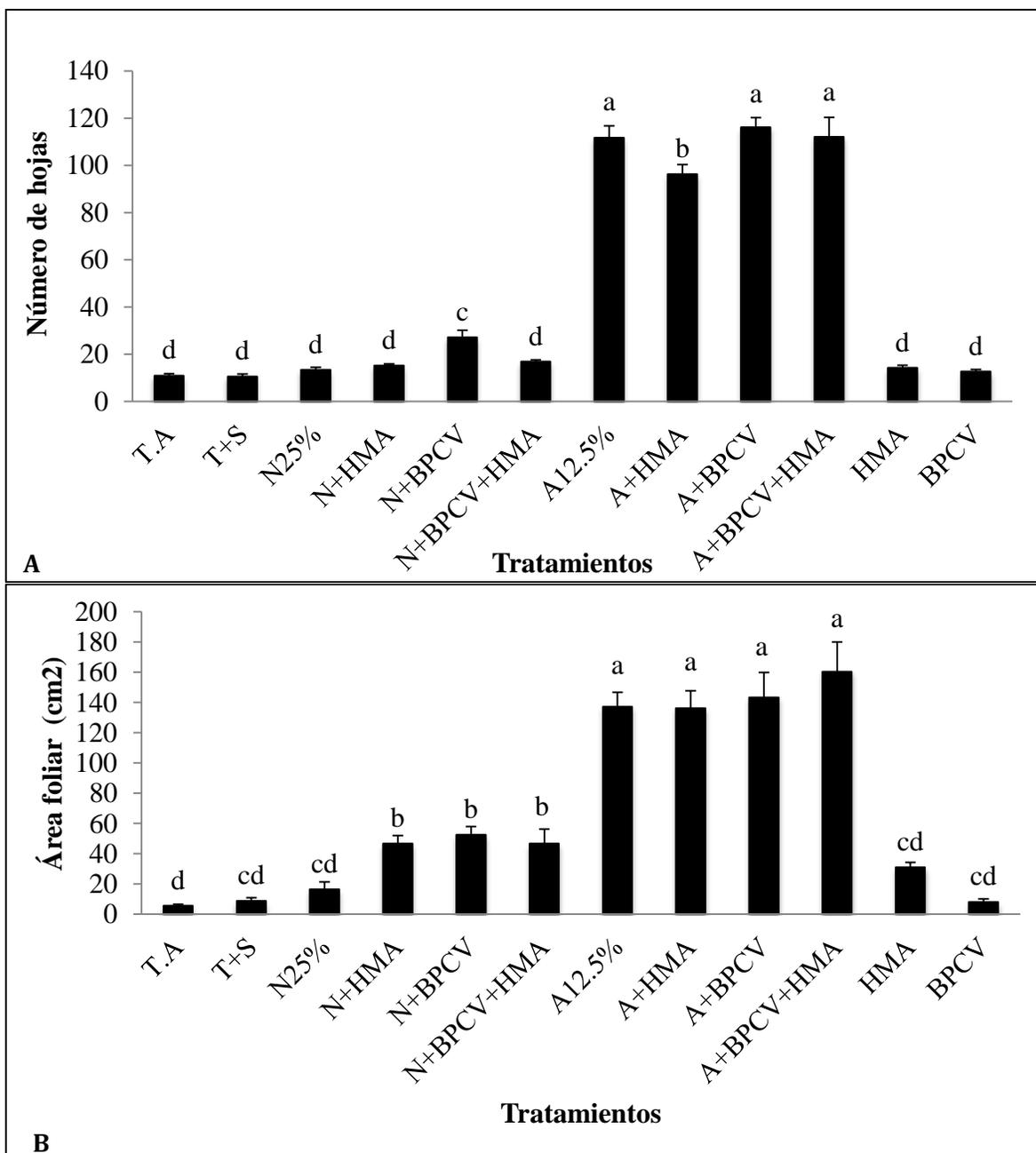
### Criterios fisiológicos y morfológicos de la aplicación con Azolla y nitrato de amonio

Al analizar el comportamiento para la fuente nitrogenada, de acuerdo con el ANOVA, los criterios morfológicos y fisiológicos evaluados de la aplicación nitrogenada con Azolla en la concentración 12.5% presentó efectos significativos, así mismo en combinación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) y hongo micorrízico arbuscular (HMA) en comparación con el testigo absoluto y el testigo más solución, favoreciendo los valores más elevados sobre las variables en las cuales tuvieron influencia. Pero no hubo diferencias significativas por los efectos de la aplicación nitrato de amonio 25%, BPCV y HMA, por si solos (Figura 1).

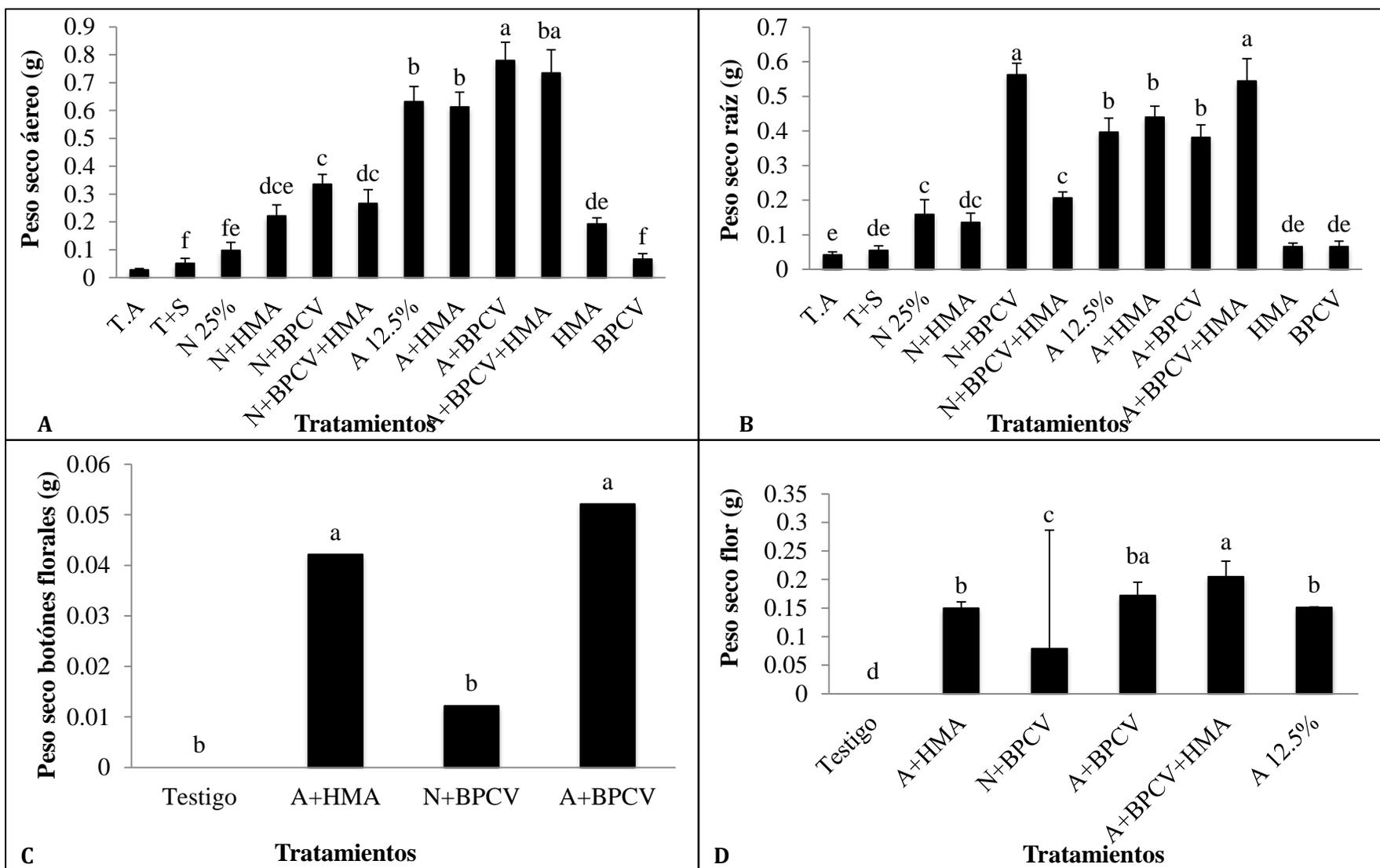
En el tratamiento con nitrato de amonio 25%, las respuestas más contrastantes relacionadas con la morfología y fisiología se presentaron en combinación con bacterias y hongo micorrízico. El testigo (sin fertilización) presentó 11 hojas en promedio por planta (Figura 1A) y 5.61 cm<sup>2</sup> de área foliar en promedio (Figura 1B), el testigo más solución (11 hojas por planta en promedio y 5.61 cm<sup>2</sup> en área foliar), BPCV (12.7 hojas en promedio por planta y 8.05 cm<sup>2</sup> de área foliar), HMA (14.3 hojas por planta y 31.07 cm<sup>2</sup> de área foliar) con relación a las plantas fertilizadas con nitrato de amonio (36.4 hojas en promedio por planta y 40.66 cm<sup>2</sup> de área foliar ) y *Azolla* (109.125 hojas en promedio por planta y 144.32 cm<sup>2</sup> de área foliar) (Figura 1A y 1B). El mismo efecto sucedió con el peso seco aéreo, en cuyo caso, el testigo sin fertilización presentó 0.027 g en promedio, 0.042 g en promedio por planta para peso seco en raíz; el testigo más solución presentó 0.051 g en promedio para peso seco aéreo y 0.055 g de peso seco en raíz (Figura 2A y 2C); los testigos no presentaron emergencia de botón y por lo tanto no hubo presencia de flores (Figura 2C y 2D), en comparación con los tratamientos fertilizados con 0.689 g de peso seco aéreo, 0.440 g para peso seco de raíz, 0.035 g para peso seco de botón por planta y 0.1514 g de peso seco en promedio por flor para *Azolla* (Figura 2A, 2B, 2C y 2D) y 0.230 g en promedio de peso seco aéreo, 0.029 g para peso seco de raíz y 0.035 g de peso seco en promedio por planta para botón con relación a la fertilización con nitrato de amonio. En este tratamiento no hubo presencia de botón floral ni de flores; para los tratamientos con BPCV y HMA, por si solos, se presentó 0.066 g y 0.015 g de peso seco aéreo en promedio y 0.066 g , 0.009 g de peso seco en raíz. Para estos tratamientos no hubo presencia de botón floral y por lo tanto no presentaron presencia de

flores (Figura 2A, 2B, 2C Y 2D).

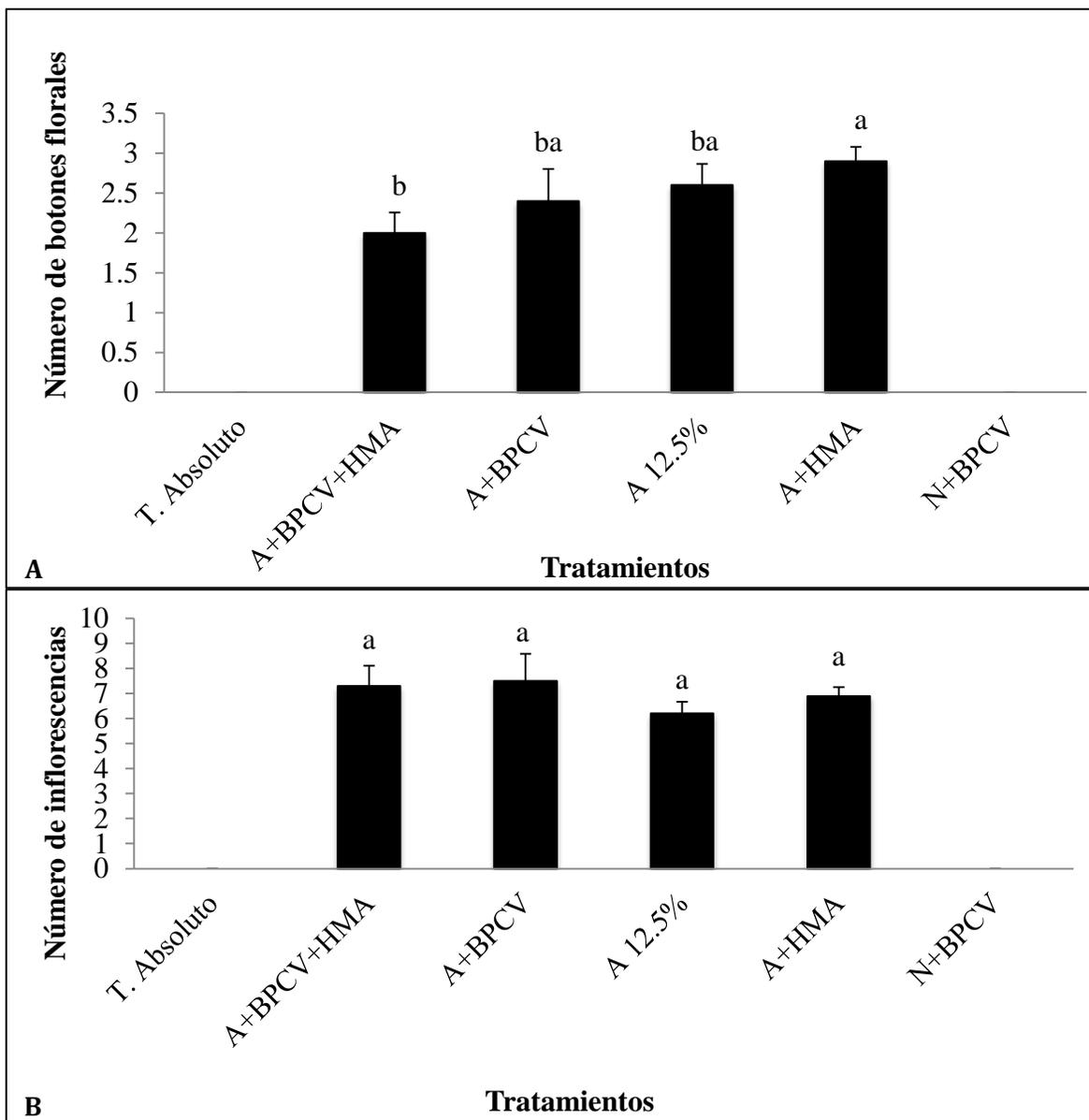
En cuanto a número de flores y botón por planta en los tratamientos fertilizados con *Azolla* 12.5%, ya sea sola o en combinación con el hongo micorrízico arbuscular y el consorcio bacteriano, se presentaron los siguientes resultados de acuerdo al ANOVA. *Azolla* 12.5% presentó 6.2 flores en promedio por planta y 2.6 botones por planta; *Azolla* + BPCV 7.5 flores en promedio, 2.4 botones en promedio por planta; *Azolla* + BPCV + HMA 6.9 flores en promedio por planta y 2 botones por planta (Figura 3B y 3A).



**Figura 1.** Efecto de la fertilización nitrogenada y su interacción con un consorcio bacteriano y hongo micorrízico arbuscular en: **1A)** Número de hojas en promedio por planta a 152 ddt. **1B)** Área foliar en promedio por planta a 152 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente grafica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha = 0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.



**Figura 2.** Efecto de la fertilización nitrogenada y su interacción con un consorcio bacteriano y hongo micorrízico arbuscular en: **2A)** peso seco aéreo a 152 ddt. **2B)** peso seco raíz a 152 ddt. **2C)** Peso seco botones florales y **2D)** peso seco de la flor a 152 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente grafica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha = 0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.



**Figura 3.** Efecto de la fertilización nitrogenada y su interacción con un consorcio bacteriano y hongo micorrízico arbuscular en: **3A)** Número de botón en promedio por planta a 152 ddt. **3B)** número de inflorescencias por planta a 152 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente grafica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha = 0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.

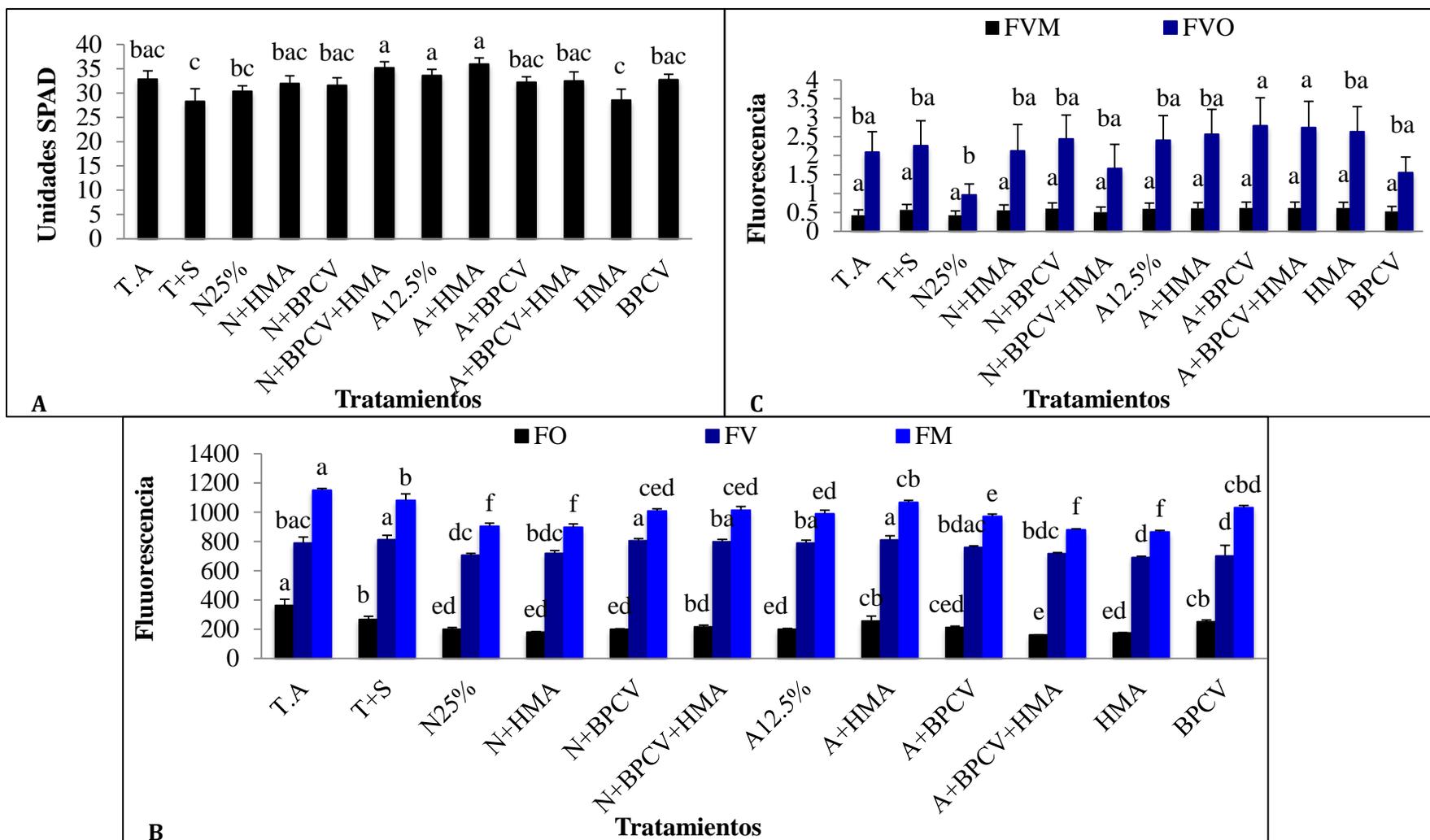
### Clorofila de las plantas de caléndula

La fluorescencia (FO= fluorescencia mínima, FM= fluorescencia máxima, FV= fluorescencia variable, FT= fluorescencia terminal, FV/FM= eficiencia fotoquímica máxima y FV/O= fluorescencia fotoquímica mínima) y unidades SPAD se midieron durante la emergencia de botones florales (60 ddt) y periodo de floración (150 ddt).

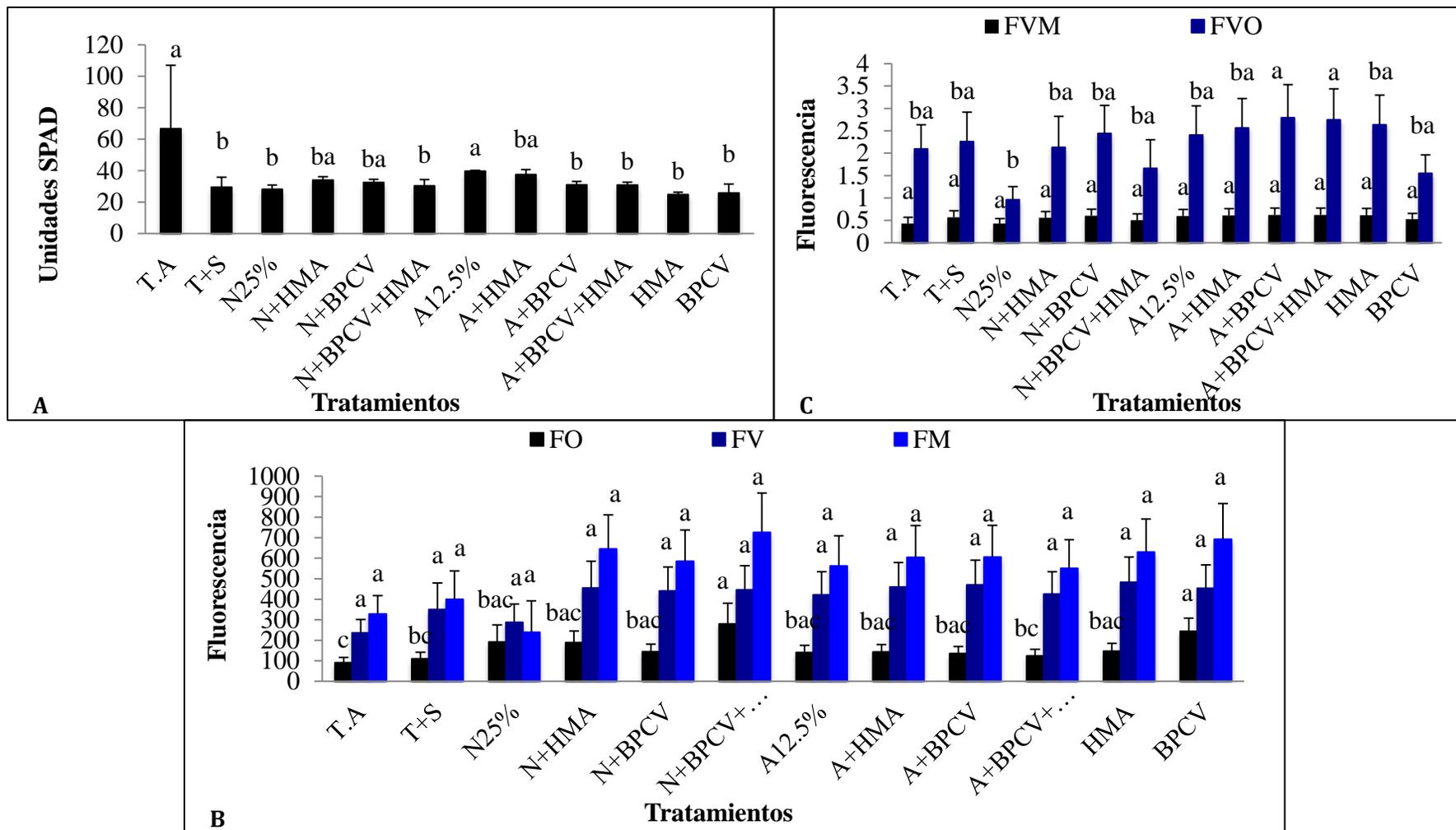
Los resultados del análisis estadístico reportaron efectos significativos para unidades SPAD (emergencia de botón - 60 ddt) en respuesta a la aplicación de nitrógeno 25% en combinación con BPCV y HMA (35.2); *Azolla* 12.5% por si sola (33.62) y en combinación con HMA (35.96), en comparación con los demás tratamientos fertilizados y los testigos (Figura 4). Para el testigo absoluto se reportó 32.84 unidades SPAD, testigo más solución 28.3 unidades SPAD (Figura 4); HMA 28.54 y BPCV 32.76 unidades SPAD en promedio (Figura 4). Los tratamientos con nitrato de amonio en combinación con BPCV y HMA reportaron 31.2, y *Azolla* en combinación con BPCV y HMA 32.36 unidades SPAD en promedio (Figura 4A).

Para fluorescencia (mediciones de fluorescencia de la clorofila) se puede observar diferencia significativa en los testigos (absoluto y con solución) tanto en fluorescencia mínima (362.6), variable (788.8) y máxima (1151.4) en promedio; en testigo más solución 266.6 para fluorescencia mínima, 812 para fluorescencia variable y 1082 para fluorescencia máxima (Figura 4B). En los tratamientos fertilizados con *Azolla* se presento un promedio de 207.15 para fluorescencia mínima, 768.8 en fluorescencia variable y 977 en fluorescencia máxima; Para los tratamientos fertilizados con nitrato de amonio 198.4 para fluorescencia mínima. 757.2 para fluorescencia variable y 956.6 para fluorescencia máxima; en los tratamientos inoculados con BPCV y HMA (251 y 174 en fluorescencia mínima), 690 y 701 en fluorescencia variable, 865 y 1032 para fluorescencia máxima. (Figura 4B). En eficiencia fotoquímica mínima los tratamientos fertilizados con *Azolla* mostraron efecto significativo (4.43) en promedio (Figura 4B); fertilizados con nitrato de amonio 3.95 en promedio, en comparación con los testigos (absoluto y más solución) que presentaron 2.33 y 3.11 en promedio; HMA 3.9 y HMA 3.1 en promedio (Figura 4B). En eficiencia fotoquímica máxima, no se observaron efectos significativos para los tratamientos fertilizados con nitrato de amonio (0.700) y *Azolla* (0.798), ya sea aplicados solos o en combinación con BPCV y HMA (0.79 para el primero y 0.785 para el segundo), en comparación con los testigos, HMA y BPCV (absoluto 0.684 y más solución 0.754, 0.79 y 0.75) (Figura 4C).

Las unidades SPAD a los 150 ddt, en floración (tercer corte de flor), no mostró efectos significativos para los tratamientos fertilizados con nitrato de amonio y *Azolla*, ya sea solos (28.12 y 39.66 ) o en combinación con HMA y BPCV (22.19 y 33.14), en comparación con los testigos (66.64 para absoluto y 29.52 para testigo más solución, HMA y BPCV (24.86 y 25.8 unidades SPAD en promedio) (Figura 5A). Para fluorescencia mínima no hubo diferencias significativas para los tratamientos fertilizados con nitrato y *Azolla* (solos o en combinación con BPCV y HMA) e inoculados con BPCV y HMA, en comparación con los testigos (absoluto y más solución) (Figura 5B). En fluorescencia variable, no se presentaron efectos significativos por parte de los tratamientos fertilizados (con *Azolla* y nitrato de amonio) ni por parte de los tratamientos inoculados con BPCV y HMA, siendo significativamente igual a los testigos (Figura 5B); Para fluorescencia máxima los tratamientos BPCV y N+BPC+HMA (692 y 725.8) fueron significativamente diferentes a los demás tratamientos fertilizados (580.6 para *Azolla* y 548.9 para nitrato de amonio, en promedio) e inoculados y los testigos (328 para el absoluto y 349.4 con solución) (Figura 5B). En eficiencia fotoquímica máxima no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos y los testigos. Para eficiencia fotoquímica mínima se observó diferencias en los tratamientos A+BPCV+HMA y A+BPCV (0.618 y 0.61) en comparación con los testigos (0.4 para absoluto y 0.56 más solución) y el resto de los tratamientos (0.6 para HMA, 0.5 para BPCV y 0.52 para nitrato de amonio) en promedio (Figura 5C).



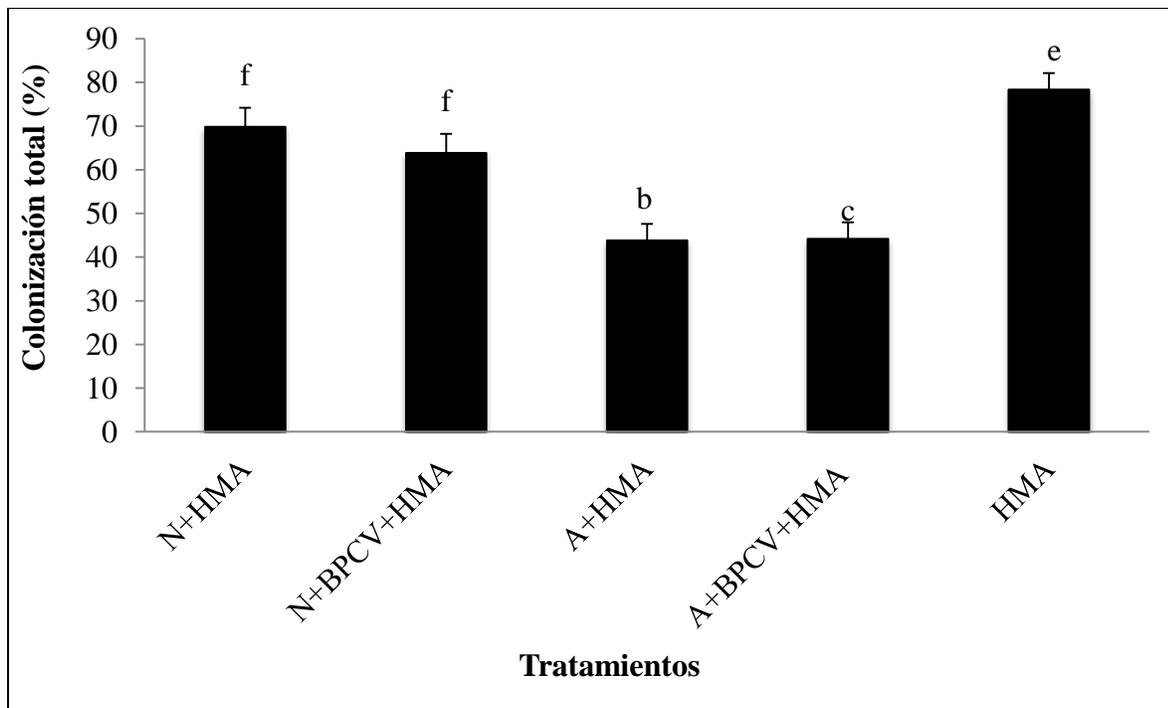
**Figura 4.** Efecto de la fertilización nitrogenada y su interacción con un consorcio bacteriano y hongo micorrízico arbuscular en: **4A)** unidades SPAD a 60 ddt. **4B)** Fluorescencia a 60 ddt y **4C)** Capacidad fotosintética a 60 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente grafica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha = 0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.



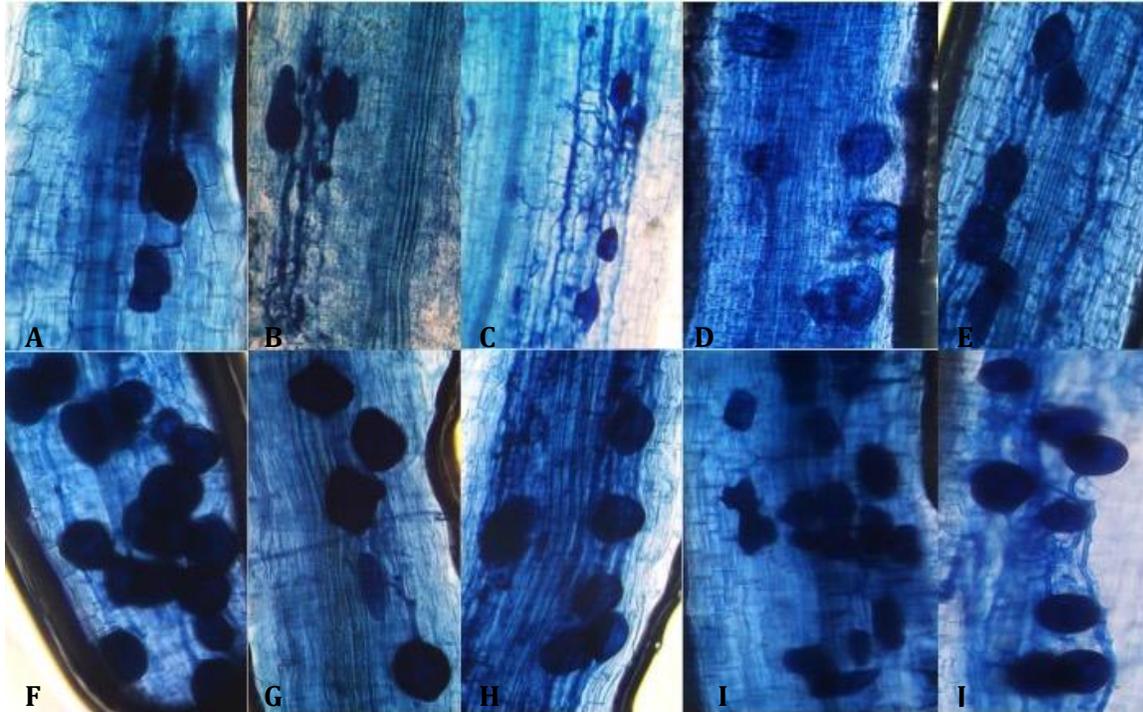
**Figura 5.** Efecto de la fertilización nitrogenada y su interacción con un consorcio bacteriano y hongo micorrízico arbuscular en: **5A)** unidades SPAD a 150 ddt. **5B).** Para Fluorescencia a 150 ddt y **4C).** Capacidad fotosintética a 150 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente grafica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha = 0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.

### Efecto en la colonización micorrizica

Los resultados mostraron significancia estadística para la interacción hongo-planta en comparación con los tratamientos fertilizados. El porcentaje de colonización total (Figura 6) en raíz de planta de caléndula fue mayor en la inoculación solo con el hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Rhizophagus intraradices*. En promedio se obtuvo un porcentaje de colonización total de 78.33% en las plantas inoculadas solo con el hongo, mientras que en las plantas inoculadas con HMA y nitrato de amonio fue de 69.83% (Figura 6); en las inoculadas con *Azolla* y HMA fue de 43.83%, las inoculadas con nitrógeno + BPCV + HMA fue de 63.83% y 44.17% para *Azolla* + BPCV + HMA.



**Figura 6.** Efecto en la colonización micorrizica de caléndula por *Rhizophagus intraradices* a los 152 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras de su correspondiente grafica no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha = 0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.



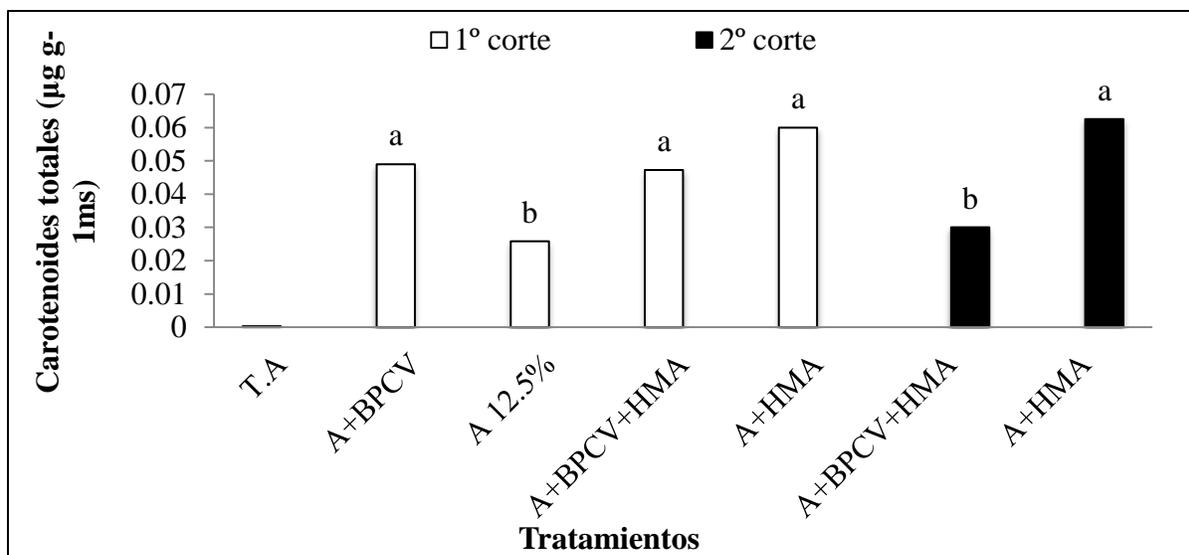
**Figura 7.** Estructuras del HMA formadas en la raíz de caléndula, con nitrato de amonio y *Azolla* (observadas a 40x) a los 152 ddt. Letras: **A-B)** *Azolla* + HMA; **C-D)** nitrógeno + BPCV + HMA; **E-F)** *Azolla* + BPCV + HMA; **G-H)** nitrógeno + HMA; **I-J)** HMA.

### **Efecto de la fertilización nitrogenada en el contenido de carotenoides totales**

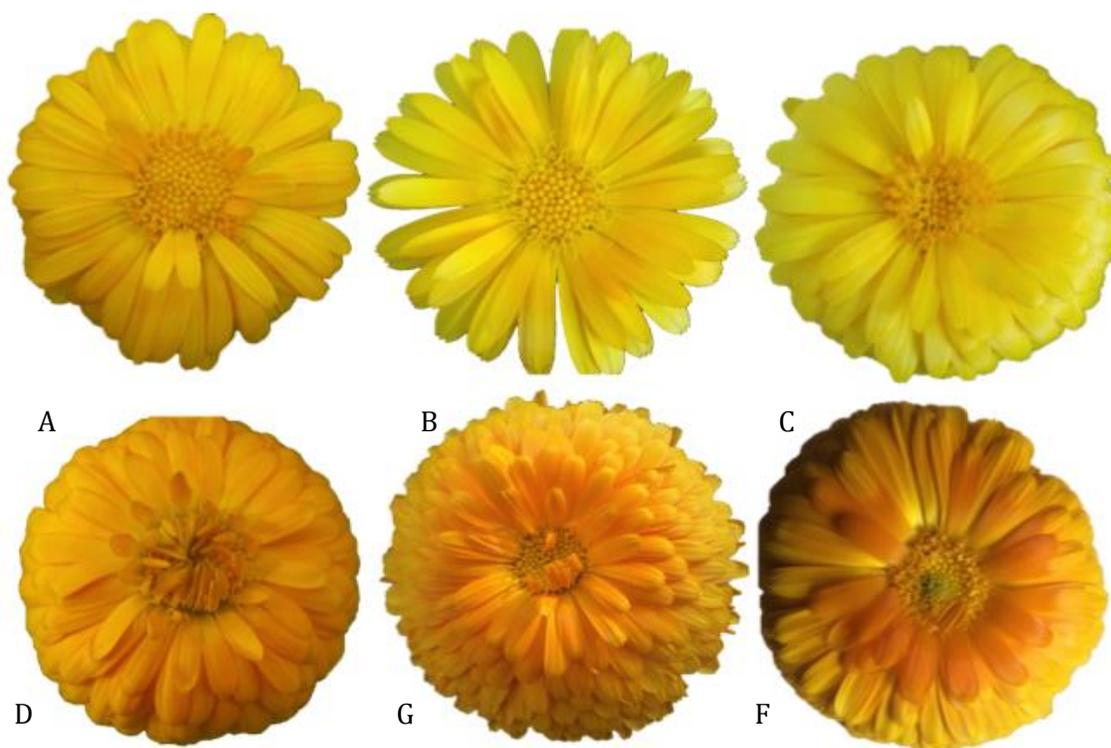
Con respecto a la concentración de carotenoides totales, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos fertilizados con *Azolla* (en los dos cortes). A+HMA presentó  $0.05 \mu\text{g g}^{-1}$  de materia seca en promedio (en el primer corte);  $0.048 \mu\text{g g}^{-1}$  para A+BPCV en el primer corte; A+BPCV+HMA y *Azolla* 12.5% presentaron  $0.04$  y  $0.02 \mu\text{g g}^{-1}$  de materia seca en promedio (primer corte) (Figura 8).

En el segundo corte, se encontraron diferencias significativas en las plantas fertilizadas con *Azolla* más BPCV y HMA ( $0.03 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco) y  $0.06 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco para A+HMA en promedio, en comparación con el blanco y los testigos que no presentaron emergencia de botón y por tanto no hubo floración (Figura 8).

En ambos cortes hubo presencia de inflorescencias color naranja (tratamiento de A+HMA y A+BPCV+HMA) y amarillo (A 12.5% y A+BPCV) (Figura 9).



**Figura 8.** Efecto de la fertilización nitrogenada con *Azolla*-BPCV-HMA en el contenido de carotenoides totales a los 152 ddt. Medias con la misma letra sobre las barras no son significativamente diferentes (LSD,  $\alpha = 0.05$ ). Medias  $\pm$  error estándar.



**Figura 9.** Presencia de inflorescencia color amarilla y naranja (Variedad Calipso), a los 60 ddt (A,D) y 152 ddt (B-C, G-F). **A-B)** A 12.5% y **C)** A+BPCV, **D-G)** A+HMA y **F)** A+BPCV+HMA.

## Discusión

### Criterios fisiológicos y morfológicos de la aplicación con *Azolla* y nitrato de amonio

De acuerdo a los resultados obtenidos de este estudio, en plantas de caléndula la fertilización nitrogenada, ya sea con nitrato de amonio 25% con *Azolla* al 12.5%, es una práctica recomendable que mejora la calidad morfológica y fisiológica, excepto si se aplican a altas concentraciones. El tratamiento que favoreció las variables de número de hojas y área foliar fue el de *Azolla* 12.5%, solo o en combinación con BPCV y HMA (Figura 1). Las respuestas de crecimiento analizadas peso seco aéreo, peso seco raíz, peso seco y número de botones florales y flores reflejaron el efecto de la fertilización con *Azolla* 12.5% sola y en combinación con BPCV y HMA (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 3A Y 3B). La densidad de plantas y fertilización nitrogenada son dos factores eficaces para el establecimiento de la parte aérea y algunos juegan un rol importante en la absorción de luz, teniendo como resultado un incremento en la producción cuantitativa y cualitativa (Thomas y Thorne, 1975). Por otra parte, el uso de fertilizantes, especialmente nitrogenados, puede aumentar el rendimiento de los cultivos sino que también pueden aumentar la eficacia de las plantas medicinales a producir los metabolitos o a cambiar la composición de las sustancias activas (Greewood, 1991). Krol (2011a, 2011b) observó un mayor número de inflorescencias en la variedad “Orange” cuando se utilizó la fertilización nitrogenada en la tasa más alta (160 kg N ha<sup>-1</sup>) y también observó un mayor rendimiento en número de botón floral por planta y aceites esenciales. Al experimentar las plantas de los tratamientos fertilizados con *Azolla*, su crecimiento y floración no se vio interrumpido.

En otras especies de Asteráceas, se ha documentado el efecto benéfico de la fertilización nitrogenada como práctica para mejorar la calidad de la planta. Tal es el caso de los trabajos realizados por Krol (2011a, 2011b). Dicho autor evaluó diferentes niveles de fertilización nitrogenada en plantas de caléndula, con las mismas intensidades probadas en el presente estudio [(0, 40, 80, 120 y 160 kg de N ha<sup>-1</sup>, (75, 50 y 25%)], pero en cambio, obtuvieron mayores incrementos en la acumulación de biomasa seca, tanto aérea como radical, número de botones florales y contenido de aceites esenciales. Contrastando así con los resultados obtenidos (Figura 3A) por posibles diferencias entre variedades y clima. Por otra parte, Rahmani *et al.* (2011) indican que las variaciones en la capacidad de almacenar carbohidratos y aprovecharlos, radica en que la fertilización nitrogenada generalmente causa deficiencia de potasio, el aumento de

almacenamiento de carbohidratos y proteínas reducidas, alteración en el equilibrio de aminoácidos y, por consiguiente cambio en la calidad de las proteínas y estas son un elemento principal en la producción de clorofila; relacionada con el área foliar. Es posible que por ello, se presento un peso seco bajo en plantas fertilizadas con nitrato de amonio, debido a la reducción del área de la fotosíntesis en hoja (Figuras 1 y 2).

A diferencia de los tratamientos no fertilizados, la hipótesis de que la carga exponencial de fertilización mejora los atributos morfológicos y fisiológicos de calidad de las plantas es soportada por los resultados obtenidos en este estudio. No existen reportes particulares en esta especie, en cuanto a la fertilización nitrogenada con *Azolla*-bacterias promotoras de crecimiento vegetal-hongo micorrízico arbuscular; no obstante, el efecto favorable del suministro o inoculación por parte de BPCV y HMA sobre el crecimiento y demás características relacionadas con la calidad de la planta durante la fase de floración ha sido estudiado por Latef *et al.*, (2011), Koeberl *et al.*, (2013), Bona *et al.*, (2014). Según Johnson y Gesch (2013), al ajustarse esta técnica (de fertilización nitrogenada) a las plantas suministra adecuadamente, de acuerdo con los requerimientos en cada fase de crecimiento, la cantidad de nutrimentos que favorecen el crecimiento. La respuesta en los criterios morfológicos evaluados en este estudio denotaron este efecto, en especial los fertilizados con *Azolla* en el periodo de floración (Figuras 1, 2 y 3 ). Aunque no hay reportes particulares de fertilización con *Azolla* en esta especie, sobre el crecimiento y demás características relacionadas con la producción de la planta en sus fases de desarrollo, hay estudios realizados en cultivos de pepino y lechuga y se ha observado el potencial de *Azolla* en el control de plagas y como fertilizante orgánico (Castro *et al.*, 2009; Bharati *et al.*, 2000).

La promoción de un mayor crecimiento aéreo derivado del crecimiento y la expansión foliar propició el aprovechamiento de recursos (luz, CO<sub>2</sub>); de esa manera el incremento del peso seco por efecto de tal régimen de fertilización fue evidente (Figura 2). Rahmani *et al.*, (2011) reportaron altas tasas fotosintéticas (producción de clorofila) en plantas de caléndula cuando estas disponen de un área foliar grande; lo cual es consistente con lo indicado por Johnson y Gesch (2013), quienes destacan la ventaja que tiene una planta grande en captar y aprovechar recursos para promover aumentos en la tasa de fotosíntesis que inducen mayores ganancias fotosintéticas que satisfacen las demandas energéticas para el mantenimiento de la biomasa

existente y la síntesis de nuevos tejidos (Gan *et al.*, 2008). Sin embargo, tanto el crecimiento de la planta como su capacidad fotosintética son dependientes de la condición nutrimental ya sea en condiciones de invernadero (Zaller *et al.*, 2011) o en campo (Wali *et al.*, 2007).

Las plantas inoculadas con HMA y BPCV en combinación con *Azolla* y nitrato de amonio, mostraron un aumento en la productividad en comparación con los testigos (no fertilizados e inoculados), tanto en la concentración de 25 y 12.5% de la fertilización (Figuras 1-3). En general, la inoculación combinada e inducida en el trasplante, afectaron positivamente en el tamaño de la planta, floración, número de hojas y peso seco (Figuras 1-3). Ha sido previamente demostrado que los HMA alteran la fisiología y producción de las plantas, induciendo la floración, periodo de floración y el aumento de número de brotes de flores (Zaller *et al.*, 2011). Efectos similares se han registrado en plantas de fresa inoculadas con HMA (Bona *et al.*, 2014) y *Valerianna officinalis* (Nell *et al.*, 2010). Por otro Hameeda *et al.*, (2008), Islam *et al.*, (2013) nos dicen que las BPCV son bacterias que colonizan rizosferas de plantas a través de diversos mecanismos, como la fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato que alteran la arquitectura de la raíz y la promoción de desarrollo de la planta (producción de diferentes fitohormonas como AIA, ácido giberélico y citoquininas) (Swain *et al.*, 2007; Kloepper *et al.*, 2007).

### **Clorofila de las plantas de caléndula**

Una parte de la energía de la luz absorbida por la clorofila dentro de la hoja se utiliza en las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis. Otra parte se pierde bien como calor, o bien es reemitida como fluorescencia. A temperaturas fisiológicas, prácticamente toda la emisión de fluorescencia procede de las moléculas de clorofila asociadas con el fotosistema II (Val-Falcon y Monge-Pacheco, 1990). En el presente estudio la dosis de fertilización nitrogenada, mostraron efectos estimulantes con respecto a la fluorescencia y unidades SPAD, tanto en la etapa de botón y floración. En las plantas fertilizadas con *Azolla* y nitrato de amonio, las dosis más altas resultaron ser inhibitorias en las dos etapas de desarrollo de la planta (evaluadas) (Figuras 4 y 5). En resultados anteriores, se encontró aumento de área foliar en plantas fertilizadas, a veces esto ha sido interpretado como una estrategia de la planta para compensar otros cambios fisiológicos negativos (Capron *et al.*, 2000). Wali *et al.*, (2004) encontraron en *Calendula officinalis* que hay un cierre de los poros de los estomas, que podría ser debido a la acumulación de CO<sub>2</sub> en

cavidades sub-estomáticas consecuencia de la inhibición de la fotosíntesis, ya que se reduce la actividad fotosintética (Iqbal *et al.*, 2000). Nakano *et al.*, (1997) dicen que la eficiencia fotosintética retardada puede estar correlacionada con una disminución en el contenido de nitrógeno de la hoja, la actividad del píruvato de fosfoenol, el contenido de clorofila y el área foliar.

La distribución de los fotoasimilados en la planta incide directamente sobre la relación raíz/parte aérea, estando influenciada esta distribución por las condiciones que ofrece el ambiente en un momento dado y por la capacidad que tenga la planta para ubicarlos en determinado órgano como respuesta a los estímulos ambientales a los que es sometida (Casierra-Posada y Rodríguez, 2006). Posiblemente estos contrastes entre los tratamientos fertilizados y testigos radican en las condiciones particulares del experimento.

Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, en los tratamientos fertilizados en comparación con los testigos en cuanto a las unidades SPAD y fluorescencia (Figuras 4 y 5), se observó mayor lámina y peso seco en las plantas fertilizadas con *Azolla*. Esto demuestra que ambas fuentes de nitrógeno utilizadas tuvieron influencia similar en el contenido de clorofila e índice SPAD en las hojas de caléndula. Sin embargo, el contenido de fluorescencia y el índice SPAD en las hojas se vieron afectados posiblemente por la dosis de nitrógeno aplicada (Figuras 4 y 5). El contenido de fluorescencia y el índice SPAD mostraron un comportamiento similar, con respuesta a la tasa de nitrógeno. A estas características se obtuvieron valor máximo estimado de 0.7 g de peso seco aéreo y 30 (en floración) y 60 (en botón) unidades SPAD, respectivamente, en los niveles de 12.5% para *Azolla* (en combinación y sola) y 25% para nitrato de amonio (en combinación y solo). El nitrógeno y materia orgánica participan en la síntesis y estructura de las moléculas de clorofila, por lo que el aumento del suministro de nitrógeno a las plantas, en una medida limitada, provee un aumento en el contenido de clorofila y la intensidad en las hojas verdes de la planta (Araújo *et al.*, 2009; Swiader y Moore, 2002; Rahmani *et al.*, 2011; Pôrto *et al.*, 2014).

### **Efecto en la colonización micorrizica**

Muchas especies de plantas pertenecientes a la familia Asteráceae son anfitriones simbios de HMA en la naturaleza, y se ha encontrado una amplia variabilidad de colonización en la raíz (Kumar *et al.*, 2010). *Rhizophagus intraradices* inoculado por si solo en las plantas de caléndula, mostró una colonización significativamente mayor, en comparación con *Azolla* y la inoculación combinada BPCV y nitrato de amonio (78% para HMA, 69% para HMA+BPCV, 43% para A+HMA, 63% para N+BPCV+HMA y 44% para A+BPCV+HMA, respectivamente) (Figura 6). Smith y Read, (2008), nos dice que la respuesta de crecimiento y colonización depende tanto de especies de hongos y plantas, de las condiciones experimentales y ambientales. Las bacterias afectan los niveles de colonización micorrizica en raíces, pero a diferentes maneras, dependiendo de que bacteria y hongo se aplique. La colonización no esta directamente relacionada con el rendimiento de la planta, si no que depende de la combinación de los microorganismos (estimulación) (Singh *et al.*, 2012). Algunas *Pseudomonas* spp., son capaces de adherirse a la superficie de las hifas de los HMA, lo que sugiere que existen mecanismos para la colonización micorrizica, como el efecto de la atracción electrostática (Bianciotto *et al.*, 1996) regido por parámetros físico-químicos, el mecanismo que implica la producción de fibrillas de celulosa u otros polímeros bacterianos (Bianciotto *et al.*, 2001) y los diferentes estados fisiológicos de las hifas (Toljander *et al.*, 2006). La colonización micorrizica se ve beneficiada a través de la interacción metabólica, tales como el intercambio de nutrientes y carbono, esto se basa en un estrecho contacto celular entre los componentes de bacterias y hongos (Garbaye, 1994).

En cuanto el efecto de la fertilización nitrogenada en la colonización micorrizica total, Camenzind *et al.*, (2014) y Kim *et al.*, (2014) nos dicen que el aumento o adición de nitrógeno provocan una disminución significativa en la abundancia extraradical e intraradical, especialmente el género *Glomales*, lo cual es el caso en el presente estudio, ya que las plantas inoculadas con HMA en combinación con fertilización nitrogenada fueron estadísticamente menor a las plantas inoculadas únicamente con el hongo (Figura 6). Los Glomerales están fuertemente vinculados al cambio de la comunidad vegetal, una reducción en las hifas extraradicales de los hongos se asocia tanto con los cambios en los factores de suelo y los cambios en la composición de la comunidad vegetal que se debe a la fertilización (Johnson *et al.*, (2008); Johnson, 2010 y Liu *et al.*, 2012). Aunque bien, una fertilización moderada de

fertilizantes minerales no suprime y mejora la colonización micorrízica y propiedades microbianas del suelo (Zubek et al., 2012).

Reynolds *et al.*, (2005) y Leigh *et al.*,(2009), dicen que los hongos arbusculares aumentan la captura de nitrógeno total en la planta, ya que tienen acceso a grandes cantidades de este, a partir de material orgánico y lo transfieren a la planta.

### **Efecto de la fertilización nitrogenada en el contenido de carotenoides totales**

Con respecto a la concentración de carotenoides totales, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos fertilizados con *Azolla* más HMA, BPCV o en combinación con ambos (primer y segundo corte), con 0.14 y 0.09  $\mu\text{g g}^{-1}$  en promedio por planta, respectivamente (Figura 8); mientras que los testigos no presentaron emergencia de botón ni floración. Naguib *et al.*, (2005) reportaron 0.03  $\text{mg g}^{-1}$  (de valor promedio) para variedades de caléndula, Bako *et al.*, (2002) reportaron 0.097  $\text{mg g}$  de carotenoides totales por peso seco en promedio y Azzaz *et al.*, (2007) obtuvieron 0.56 a 0.85  $\text{mg g}$  de carotenoides totales para inflorescencias de caléndula cultivadas sin tratamiento alguno. Fernandes *et al.*, (2013) encontraron en inflorescencias de caléndula (fertilizadas) 1.07  $\text{mg g}^{-1}$  de carotenoides totales a los 60-90 días después del trasplante y 0.96  $\text{mg g}^{-1}$  de carotenoides totales a los 151-180 días después del trasplante y Khalid, (2013) nos dice que hay un efecto positivo por parte de la fertilización en el aceite esencial con 0.05  $\text{g}$  de aceite esencial en promedio por planta. La fertilización nitrogenada tiene un alto impacto significativo en el número de cabezas de flor (botón) por planta y también modifica el contenido de aceite esencial de las flores (Król, 2011; Ganjali et al., 2010; Johnson y Gesch, 2013).

Gorsi, (2002) ha indicado que la colonización micorrízica es común en la mayoría de las plantas medicinales o estén asociados a ellas, ya que desempeñan un papel importante en el aumento de la estructura del suelo, absorción de nutrientes, crecimiento, aumento de aceites esenciales, crecimiento y diversidad biológica en la rizosfera de la planta (Smith y Lee, 2008; Araith *et al.*, 2009; Ceccarelli *et al.*, 2010; Nandini, 2014), lo cual queda demostrado en nuestro estudio al mostrar mayor contenido de carotenoides el tratamiento fertilizado y micorrizado (Figura 8).

El estudio de las bacterias en la rizosfera de las plantas medicinales, es conocido por tener impacto en el crecimiento de las plantas, también producen metabolitos, aumentan el crecimiento de las plantas y la acumulación de metabolitos en las plantas (especialmente *Bacillus* y *Pseudomonas*) (Tamiliarasi *et al.*, 2008; Bafana y Lohiya, 2013; Li *et al.*, 2013; Santoro *et al.*, 2015).

Cabe señalar que también hubo diferencias en la concentración de estos pigmentos en variedades con tonalidades distintas en sus inflorescencias, pues la concentración fue mayor en variedades de tonalidad anaranjado con respecto a las amarillas (Figura 9), tendencia que ha sido reportada por otros autores (Kishimoto *et al.*, 2005; Kishimoto y Ohmiya, 2006), lo que sugiere una correlación alta entre el contenido de carotenoides y la intensidad de color en las flores. En caléndula, las diferencias en color de los pétalos amarillo o naranja son causadas por los diferentes niveles de acumulación de luteína o carotenoide amarillo (Moehs *et al.*, 2001). Las sustancias o aceites esenciales también varían de acuerdo al tiempo de cosecha, la luz y cultivar, lo que sugiere que la biosíntesis de metabolitos no se ve tan afectada por los cambios en la composición del suelo (Kishimoto *et al.*, 2005; Khalid y Silva, 2010).

### **Conclusiones**

La fertilización nitrogenada con *Azolla* 12.5%, ya sea solo o en combinación con BPCV y HMA es recomendable para plantas de caléndula, al incrementar número de flores y botones florales, entre otras variables, a partir de los 60 días. La fertilización con nitrato de amonio, resulta ser benéfica para las plantas ya sea solo o en combinación con BPCV y HMA, pero no para la producción de botones florales. Ambas fertilizaciones en las concentraciones de 12.5 y 25%, combinadas con BPCV y HMA o solos, benefician las características morfológicas y fisiológicas de caléndula en condiciones de invernadero.

## CAPÍTULO IV

### Conclusiones generales

En *Calendula officinalis* la fertilización nitrogenada con nitrato de amonio y *Azolla* en las dosis de 12.5 y 25% tuvieron un efecto favorable en la mayoría de las variables evaluadas (número de hojas, área foliar, peso seco, número de botones y flores); sin embargo, al combinarse *Azolla* al 12.5% con BPCV y HMA se obtienen mayor rendimiento en flores y botones florales y carotenos totales, así como, en cambios morfológicos y fisiológicos. El nitrato de amonio 25% en combinación con BPCV y HMA no tiene un efecto favorable para el crecimiento y desarrollo de la planta, al no presentarse en caléndula botones florales. También hace falta abundar sobre los factores ambientales que influyen en la concentración de compuestos químicos de caléndula, como la temperatura, salinidad, sequía, etc., y detectar las enzimas y genes que regulan la concentración de los mismos.

Dicha práctica propició un menor porcentaje de colonización micorrízica en la raíces de caléndula; es decir, las plantas que no se fertilizaron y solo fueron inoculadas con HMA, mostraron mejor colonización micorrízica.

Para garantizar que las plantas de caléndula dispongan de características adecuadas para ser competitivas en sitios donde la disponibilidad de nutrientes es limitada, durante su periodo de producción en vivero o invernadero es necesario fertilizar empleando el régimen especificado en este estudio, ya sea con *Azolla* o nitrato de amonio en las dosis más significativas (12.5 y 25%).

## CAPÍTULO V

### Bibliografía

- Alarcón, A. 2001. Tecnología para cultivos de alto rendimiento. Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, árboles ornamentales i viveros. (153): 114-117.
- Araim, G.; Saleem, A.; Arnason, J. T. y Charest, C. 2009. Root colonization by an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of purple coneflower, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Journal of agricultural and food chemistry. 57 (6): 2255-2258.
- Araújo, C. B. O.; Santos, A. M.; Fernandes, L. A.; Martins, E. R., Sampaio, R. A.; Costa, C. A. y Leite, G. L. D. 2009. Uso da adubação orgânica e cobertura morta na cultura da Calêndula (*Calendula officinalis* L.). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. (11): 117-123.
- Arora, A. y Singh, P. K. 2003. Comparison of biomass productivity and nitrogen fixing potential of *Azolla* spp. Biomass Bioenerg. (24): 175-178.
- Azzaz, N. A. I; Hassan, E. A. y El-Emery, F. A. 2007 Physiological, anatomical, and biochemical studies on pot marigold (*Calendula officinalis* L.) plants. African Crop Science Conference Proceedings. (8): 1727-1738.
- Bafana, A. y Lohiya, R. 2013. Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region. World Journal Microbiology Biotechnology. (29): 63-74.
- Bakó, E.; Deli, J. y Tóth, G. 2002. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 53 (1): 241-250.
- Barman, D. y Pal, P. 1994. Effect of nitrogen and phosphorus on seed yield in *Calendula* (*Calendula officinalis* L.). Orissa Journal of Agricultural Research. 2 (7): 17-21.
- Becerra, M. 1991. *Azolla*-Anabaena, un recurso valioso para la producción agropecuaria en el Trópico. Convenio Inter- institucional para la producción agropecuaria en el Valle de Río Cauca. Colombia. Informe. p. 70.
- Benton-Jones, J. 1998. Plant nutrition manual. In: Plant Nutrition and Soil Fertility Manual. Benton-Jones, J. Jr. (Eds.) 2<sup>da</sup> ed. CRC Press. Florida. United States of America. 149 pp.

- Bharati, K.; Mohanty, S.; Singh, D.; Rao, V. y Adhya, T. 2000. Influence of incorporation or dual cropping of Azolla on methane emission from flooded alluvial soil planted to rice in eastern India. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 99 (79): 73–83.
- Bianciotto, V. y Bonfante, P. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. (81): 365-371.
- Bianciotto, V.; Bandi, C.; Minerdi, D.; Sironi, M.; Tichy, H. V. y Bonfante, P. 1996 An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. (62): 3005-3010.
- Biesiada, A. y Kuś, A., 2010. The effect of nitrogen fertilization and irrigation on yielding and nutritional status of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 9 (2): 3-12.
- Blagodatskaya, E.; Blagodatsky, S.; Anderson, T. H. y Kuzyakov, Y. 2014. Microbial growth and carbon use efficiency in the rhizosphere and root-free soil. *PLoS One. Journal. Pone*. 9 (4): e93282.
- Bona, E.; Lingua, G.; Manassero, P.; Cantamessa, S.; Marsano, F.; Todeschini, V.; Copetta, A.; Massa, N.; Avidano, L.; Gamalero, E. y Berta, G. 2014. AM fungi and PGPR *Pseudomonads* increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. *Mycorrhiza*. 25 (3): 181-193.
- Britton, G. 1985. General carotenoid method. *In: Methods in enzymology*. Law, J. H. y Rilling, H.C. (Eds.) 1985. Academic Press Inc. (Vol. 111). 191-194 pp.
- Bye, R. y Linares, M. E. 1999. Medicinal plants of México and its potential for animal health Sciences. *In: Lyons, T. P. y Jacques, K. A. (Eds.). Biotechnology in the feed industry. Proceedings of alltech's fifteenth anual symposium*. 265-294 pp.
- Camenzind, T.; Hempel, S.; Homeier, J.; Horn, S.; Velescu, A.; Wilcke, W. y Rilig, M. C. 2014. Nitrogen and phosphorus additions impact arbuscular mycorrhizal abundance and molecular diversity in a tropical montane forest. 20 (12): 3646-3659.
- Casierra-Posada, F. y S. Rodríguez. 2006. Tolerancia de plantas de feijoa (*Acca sellowiana* [Berg] Burret) a la salinidad por NaCl. *Agronomía Colombiana*. 24 (2): 258-265.

- Castro, L.O. y Chemale, V.M. 1995. Plantas medicinais, codimentares e aromáticas: descrição e cultivo. (ed. 1, Guaíba). (Editora Agropecuária). p.196.
- Castro, R.; Rodríguez, M.; Alvarez, G. E.; Gil, M.; Novo, R. y Castro, I. R. 2009. Efecto de la incorporación del abono verde *Azolla* sp. en la reducción de los daños causados por fitonematodos en cultivos de organopónicos. *Cultivos Tropicales*. (30): 10-13.
- Capron, S. J. M.; Ashenden, T. W. y Lee, J. A. 2000. The effect of exposure to NO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub> on frost hardiness in *Calluna vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany*. (43): 111-119.
- Ceccarelli, N.; Curadi, M.; Martelloni, L.; Sbrana, C.; Picciarelli, P. y Giovannetti, M. 2010. Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant properties of artichoke leaves and flower heads two years after field transplant. *Plant and soil*. (335): 311-323.
- Cenicafé. 2007. Sistemas de producción de café en Colombia. *In: consideraciones sobre la nutrición mineral y orgánica en los sistemas de producción de café*. 1<sup>ra</sup> ed. Chinchiná. Colombia. 202 pp.
- Damián-Nava, A.; Ramírez-Ramírez, I.; Peña Valdivia, C. B.; Díaz Villaseñor, G. y González Hernández, V. A. 2009. Características del intercambio de gases en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.) *Revista Chapingo Serie Horticultura*. (15): 119-126.
- Dauda, S. N.; Ajayi, F.A. y Dor, E. N. 2008. Growth and yield of water melon (*Citrullus lanatus*) as affected by poultry manure application. *Journal of Agriculture, Forestry and the Social Sciences*. (4): 121-124.
- Estrada, L. E. 2002. Códice florentino: su información etnobotánica: pp. 197-209. *In: Estrada L. E. Plantas Medicinales de México*. 2<sup>da</sup> ed. Departamento de Fitotecnia. Unidad de estudios etnobotánicos. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Fernandes, E. F. A.; Meloni, F.; Borella, J. C. y Lopes, N. P. 2013. Effect of fertilisation and harvest period on polar metabolites of *Calendula officinalis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23(5): 731-735.
- Fierroa-Alvarez, A.; Gonzalez-López. M. M.; Montiel. D. S.; Juárez. D. R.; Orozco. L. J. O. y Romualdo. J. C. 2011. La recolección y cultivo de especies medicinales y aromáticas silvestres, una propuesta de manejo sostenible. UAM. Redalyc. 1-11.

- Forni, C.; Chen, J.; Tancioni, L. y Grilli Caiola, M. 2001. Evaluation of the fern *Azolla* for growth, nitrogen and phosphorus removal from wastewater. (Pergamon). Elsevier Science. 6 (35): 1592-1598.
- Gan, Y.; Malhi, S. S.; Brandt, S.; Katepa-Mupondwa, F. y Stevenson, C. 2008. Nitrogen use efficiency and nitrogen uptake of juncea canola under diverse environments. *Agronomy Journal*. (100): 285-295.
- Ganjali, H. R.; Band, A. A.; Sharif-Abad, H. H. y Moussavi-Nik, M. 2010. Effects of sowing date, plant density and nitrogen fertilizer on yield, yield components and various traits of *Calendula officinalis*. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environment Science*. 9 (6): 672-679.
- Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* (128): 197-210.
- García, M.; Álvarez, M. y Treto, E. Estudio comparativo de diferentes especies de abonos verdes y su influencia en el cultivo del maíz. *Cultivos Tropicales*. 3 (23): 13-30.
- Gazim, Z. C.; Rezende, C. M.; Fraga, S. R.; Svidzinski, T. I. E. y Cortez, D. A. 2008. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. Brasil. 1 (39): 61-63.
- Gerdemann, J. W. y Nicolson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions British Mycological Society*. (46): 235-244.
- Gianinazzi, S.; Gollotte, A.; Binet, M. N.; Van-Tuinen, D.; Redecker, D. y Wipf, D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*. (20): 519-530.
- González, S. y Barrios, S. R. 1983. Producción de inoculo de micorrizas arbusculares. *Lat Amer Microbiol.* (25): 181-187.
- Gomes, H.E.; Vieira, M. C. y Heredia, Z. N. A. 2007. Density and plant arrangement on *Calendula officinalis* L. yield. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 3 (9): 117-23.
- Gorsi, M. S. 2002. Studies on mycorrhizal association in some medicinal plants of Azad Jammu and Kashmir. *Asian Journal and Plant Science*. (1): 383-387.

- Greewood, D.; Gastal, J.; Lemaire, G.; Drycott, A.; Millar, P. y Neeteson, J. J. 1991. Growth rate and %N of field grow crops: theory and experiments. *Annals of Botany*. (67): 181-190.
- Gröen, J. 1993. Photosynthesis of *Calendula officinalis* L. and *Impatiens parviflora* DC. influenced by light intensity during growth and age of the leaves and plants. *Mededelingen Landbounw Whoge School. Wageningen-Neaderland*. pp. 73-78.
- Guihong, M. y William, B. Evans. 2010. Effects of organic and inorganic fertilizers on Marigold grwth and flowering. *Hort Science*. 45 (9):1373-1377.
- Hameeda, B.; Harini, G.; Rupela, O. P.; Wani, S. P. y Readdy, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbial Research*. (163): 234-242.
- Hersch, M. P. 2000. Plantas medicinales: relato de una posibilidad confiscada. El estatuto de la flora en la biomedicina mexicana. Serie antropología social. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México, D.F. pp. 31.
- Hoffmann, M. y Komosa, A. 1974. Dynamika pobierania N, P, K, Ca, Mg i Na przez *Calendula officinalis* L. Cream Beauty przy zróżnicowanym nawozéniu mineralnym. *Herba Polonica*. (2): 154-165.
- Hoyos, R. M. 2000. Efecto de la *Azolla*, del compost y del humus de lombriz en los cultivos de tomate y lechuga. *Manejo ecológico de suelos*. Lima - Perú. P. 67-75.
- Iqbal, M.; Srivastava, P. S. y Siddiqi, T. O., 2000. Anthropogenic stresses in the environment and their consequences. *In: Environmental Hazards: Plants and People*. Iqbal, M.; Srivastava, P. S.; Siddiqi, T. O. (Eds). CBS Publishers. New Delhi. 1-38 pp.
- Islam, Md. R.; Sultana, T.; Joe, M. M.; Yim, W.; Cho, J. C. y Sa. T. 2013. Nitrogen fixing with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. *Journal of Basic Microbiology*. 53 (12): 1-12.
- Jensen, M. H. y Collins, W. L. 1985. Hydroponic vegetable production. *Horticultural Reviews*. (7): 483-558.
- Johnson, J. M. F. y Gesch, R. W. 2013. *Calendula* and camelina response to nitrogen fertility. *Industrial Crops and products*. (43): 684-691.

- Johnson, N. C. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist*. (185): 631-647.
- Johnson, N. C.; Rowland, D. L.; Corkidi, L. y Allen, E. B. 2008. Plant winners and losers during grassland N-eutrophication differ in biomass allocation and mycorrhizas. *Ecology*. (89): 2868-2878.
- Kapoor, R.; Chaudhary, V. y Bhatnagar, K. 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza*. (17): 581-587.
- Khalid, K. A. 2013. Effect of potassium uptake on the composition of essential oil content in *Calendula officinalis* L. flowers. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 25 (3): 189-195.
- Khalid, K. A. y Da Silva, J. A. T. 2010. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. *Scientia horticultrae*. 126 (2): 297-305.
- Kim, Y. C.; Gao, C.; Zheng, Y.; He, X. H.; Yang, W.; Chen, L.; Wan, S. Q y Guo, L. D. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungal community response to warming and nitrogen addition in a semiarid steppe ecosystem. *Mycorrhiza*. 25 (4): 267-276.
- Kishimoto, S.; Maoka, T.; Sumitomo, K. y Ohmiya, A. 2005. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 69 (11): 2122-2128.
- Kishimoto, S. y Ohmiya, A. 2006. Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Physiologia Plantarum*. 128 (3): 436-447.
- Kitoh, S. y Shiomi, N. 1991. Effect of mineral nutrients and combined nitrogen sources in the medium on growth and nitrogen fixation of the *Azolla*–*Anabaena* association. *Soil Science Plant Nutrition*. 37 (3): 419-426.
- Kloepper, J. W.; Gutierrez-Estrada, A. McInroy, J. A. 2007. Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal Microbiology*. 53 (2): 159-167.
- Koerberl, M.; Schmidt, R.; Ramadan, E. M.; Bauer, R. y Berg, G. 2013. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality, and health. *Front Microbiol*. (4): 400.

- Król, B. 2011a. Yield and the chemical composition of flowers heads of pot Marigold (*Calendula officinalis* L. cv. Orange King) depending on nitrogen fertilization. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum*. 10 (2): 235-243.
- Król, B. 2011b. The effect of different nitrogen fertilization rates on yield and quality of Marigold (*Calendula officinalis* L. "Tokaj") raw material. *Acta Agrobotanica*. 64 (3): 29-34.
- Kumar, A.; Mangla, C.; Aggarwal, A. y Parkash, V. 2010 Arbuscular mycorrhizal fungal dynamics in the rhizospheric soil of five medicinal plants species. *Middle East Journal Scientific Research*. (6): 281-288.
- Latef, A. A. H. A. y Chaoxing, H. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulture*. (127): 228-233.
- Leigh, J. Hodge, A. y Fitter, A. H. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytologist*. (181): 199-207.
- Li, X. L.; Jiang, H. M.; Zhang, B.; Tang, G. Q.; Penttinen, P.; Zeng, Z.; Zheng, L. Y. y Zhang, X. P. 2013. Endophytic bacterial diversity in *Codonopsis pilosula*, *Ephedra sinica*, and *Lamiophlomis rotata*: a study with LH-PCR. *Journal Applied Ecology*. (24): 2511-2517.
- Liu, J. N.; Zhou, Q. X.; Sun, T.; Ma, L. Q. y Wang, S. 2008. Growth responses of three ornamental plants to Cd and Cd-Pb stress and their metal accumulation characteristics. *Journal of Hazardous Materials*. (1): 261-267.
- Liu, G. N. y Zhu, G. J. 2009. The metabolomics of carotenoids in engineered cell factory. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (83): 989-99.
- Liu, Y.; Shi, G.; Mao, L.; Cheng, G.; Jiang, S.; Ma, X.; An, L.; Du, G.; Johnson, N. C. y Feng, H. 2012. Direct and indirect influences of 8 yr of nitrogen and phosphorus fertilization on Glomeromycota in an alpine meadow ecosystem. *New Phytologist*. 194 (2): 523-535.
- Llorente-Bousquets, J. y Ocegueda, S. 2008. "Estado del conocimiento de la biota" *In*: Capital Natural de México (vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad). (México, D.F: Conabio). pp. 283-322.
- Martins, E. R. Castro, D. M. y Castellani, D. C. 1994. Plantas Mediciniais. Universidade Federal de Vicosa. (Ed. 1: Viçosa). (Brasil: Imprensa Universitaria). pp.1994-220.

- Moehs, C. P.; Tian, L.; Osteryoung, K. W. y Della-Penna, D. 2001. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Molecular Biology*. (45): 281-293.
- Moreira, P. A.; Marchetti, M. E.; Vieira, M. C.; Novelino, J. O.; Gonçalves, M. C. y Robaina, A. D. 2005. Desenvolvimento vegetativo e teor foliar de macronutrientes da calendula (*Calendula officinalis* L.) adubada com nitrogênio e fósforo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 1 (8): 18-23.
- Naguib, M. Y.; Khalil, M. Y. y El-Sherbeny, E. E. 2005. A comparative study the productivity and chemical constituents of various sources and species of calendula plants as effect by two foliar fertilizers. *Journal of Applied Sciences Research*. 1 (2): 176-189.
- Nakano, H.; Makino, A. y Mae, T. 1997. The effect of elevated partial pressure of CO<sub>2</sub> on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiology*. (115): 191-198.
- Nandini, R. T.S. 2014. Effect of AM on medicinally significant plant *Solanum surattense* Burn F. *International Journal of Advance Research in Biological Science*. 1 (6): 296-301.
- Nell, M.; Wawrosch, C.; Steinkellner, S.; Vierheilig, H.; Kopp, B.; Lössl, A.; Franz C, Novak, J. y Zitterl-Eglseer, K. 2010. Root colonization by symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi increases sesquiterpenic acid concentration in *Valeriana officinalis* L. *Planta Medica Journal*. (76): 393-398.
- Parsons, L. R. 1979. Breeding for drought resistance: what plant characteristics impart resistance? *Horticultural Science*. (14): 590-593.
- Phillips, J. M. y Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Mycology Society*. (55): 158-162.
- Pôrto, M.; Puiatti, M.; Fontes, P. C. R.; Cecon, P. R. y Alves, J. 2014. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio na cultura do pepino japonês em ambiente protegido. *Horticultural Brasileira*. 3 (32): 292-296.
- Preethi, K. C.; Kuttan, G. y Kuttan, R. 2006. Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers *in Vitro* and *in Vivo*. *Indian. Pharmaceutical Biology*. 9 (44): 691-697.

- Quintero, R. L. 1995. El sistema simbiótico fijador de nitrógeno *Azolla-Anabaena*. In: Agromicrobiología. Elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados de Ciencias Agrícolas, Montecillo. Estado de México. pp. 127-143.
- Rahmani, N.; Daneshian, J.; Farahani, H.A. y Taherkhani, T. 2011. Evaluation of nitrogenous fertilizer influence on oil variations of *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) under drought stress conditions. *Journal Medicinal Plants Research*. (5): 696-701.
- Rao, I. M. 2009. Essential plant nutrients and their functions. In: Centro Internacional de Agricultura Tropical (Eds.). (CIAT) (Vol. 36). Cali. Colombia. 36 pp.
- Raviv, M. 2010. The use of mycorrhiza in organically grown crops under semi arid conditions: a review of benefits, constraints and future challenges. *Symbiosis*. (52): 65-74.
- Reynolds, H. L.; Hartley, A. E.; Vogelsang, K. M.; Bever, J. D. y Schultz, P. A. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi do not enhance nitrogen acquisition and growth of old-field perennials under low nitrogen supply in glasshouse culture. *New Phytologist*. (167): 869-880.
- Romero-Félix, C. S. 2012. Cinéticas fotosintéticas del frijol (*Phaseolus vulgaris*) sometido a déficit hídrico. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 73 pp.
- SAS, Institute. 2002. SAS/STAT user's guide. Release 9.1. SAS Institute. Cary, N. C, USA.
- Santoro, M. V.; Cappellari, L.; Giordano, W. y Banchio, E. 2015. Systemic induction of secondary metabolite biosynthesis in Medicinal Aromatic Plants mediated by Rhizobacteria. India. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. Springer International Publishing. 13. 263-285 pp.
- SCCS. 2010. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. In: Ciencia del suelo principios básicos. 1<sup>ra</sup> ed. D. C. Guadalupe, Bogotá, Colombia. 594 pp.
- Serra, A. P.; Marchetti, M. E.; Vieira, M. C.; Robaina, A. D.; Veronesi, C. O.; Nascimento, J.M.; Matos, F.; Conrad, V. A.; Moraes, H. S. y Guimarães, F. C.N. 2010. Eficiência nutricional do Nitrogênio e produção de biomassa em *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) em condições de casa de vegetação. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 1(15): 78-85.
- Shokrani, F. y Pirzad, A. 2012. Evaluation of biological nitrogen Influence on oil variations and nutrient content of *Calendula officinalis* L. Under drought stress conditions. *Middle-East Journal of*

- Scientific Research. 11 (11): 1550-1555.
- Sigedar, P. D.; Anserwadekar, K. W. y Rodge, B. M. 1991. Effect of different levels of nitrogen, phosphorus and potassium on growth and yield of *Calendula officinalis* Linn. South Indian Horticulture. New Delhi. 4 (39): 308-311.
- Singh, R.; Soni, S. K. y Kalra, A. 2012. Synergy between *Glomus fasciculatum* and a beneficial *Pseudomonas* in reducing root diseases and improving yield and forskolin content in *Coleus forskohlii* Briq. Under organic field conditions. Mycorrhiza. 23 (1): 35-44.
- Smith, S. E. y Read, D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press (Eds.). London. 800 p.
- Soundarapandian, S. y Dhandauthapani K. 2010. Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and edophytes with medicinal plants-new avenues for phytochemicals. Journal of Phytology. (2): 91-100.
- Strickland, J. D. H. y Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawaters analysis. (Ottawa, 170 p). In: Bull. Fish. Res. Bd. Can. (Eds.). (Vol 167). Los Angeles, California. 1-20 pp.
- Sun, J.; Peng, M.; Wang, Y.; Li, W. y Xia, Q. 2013. The effects of different disease-resistant cultivars of banana on rhizosphere microbial communities and enzyme activities. FEMS Microbiological Letters. 345 (2): 121-126.
- Swain, M. R.; Naskar, S. K. y Ray, R. C. 2007. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotunata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. Polish Journal of Microbiology. 56 (2): 103-102.
- Swiader, J. M. y Moore. A. 2002. SPAD chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. Journal of Plant Nutrition. (25): 1089-1100.
- Tamilarasi, S.; Nanthakumar, K.; Karthikeyan, K. y Lakshmanaperumalsamy, P. 2008 Diversity of root associated microorganisms of selected medicinal plants and influence of rhizomicroorganisms on the antimicrobial property of *Coriandrum sativum*. Journal Environmental Biology. (29): 127-134.
- Thomas, S. M. y Thorne, J. N. 1975. Effect of nitrogen fertilizer on photosynthesis and ribulos 1,5 diphosphate carboxylase activity in spring wheat in the field. Journal Experimental Botany. (26): 43-51.

- Tilak, K. V. B. R. y B.S. Reddy. 2006. *B. cereus* and *B. circulans* novel inoculants for crops. *Current Science*. (5): 642-644.
- Toljander, J. F.; Artursson, V.; Paul, L. R.; Jansson, J. K. y Finlay, R. D. 2006. Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiol Letters*. (254): 34-40.
- Turner, T. R.; Ramakrishnan, K.; Walshaw, J.; Heavens, D.; Alston, M.; Swarbreck, D.; Osbourn, A.; Grant, A. y Poole, P. S. 2013. Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME Journal*. 7 (12): 2248-58.
- Valencia, A. G. 1999. Fisiología, nutrición y fertilización del cafeto. *In: Agro insumos del café S.A. Cenicafe (Eds.)*. (Vol 1.). Chinchiná, Colombia. 94 pp.
- Val-Falcon, J. y Monge-Pacheco, E. 1990. Fosforilación del fotosistema 2. Regulación de la energía luminosa en fotosíntesis. *Cartuja Aula Dei*. 20 (1): 125-148.
- Van-Hove, C. 1989. Uso de la Simbiosis *Azolla*-*Anabaena* con énfasis en África. Roma. FAO. pp. 53.
- Verporte, R.; Contin, A. y Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry*. (1): 13-25.
- Vestberg, M.; Kahiluoto H. y Wallius, E. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity and species dominance in a temperate soil with long-term conventional and low-input cropping systems. *Mycorrhiza*. (21): 351-361.
- Vieira, M. C. Maria, C.; Heredia, Z.; Nestor, A. y Ramos Marisa, B. M. 1999. Crescimento e produção de capítulos de calêndula (*Calendula officinalis* L.), em função de cama-de-aviário semi-decomposta e de fósforo. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2 (1). 45-51.
- Wali, B.; Iqbal, M. y Mahmooduzzafar. 2007. Anatomical and function responses of *Calendula officinalis* L. stress as observed at different stages of plant development. *Science Direct. Elsevier*. (2007): 268-280.
- Wali, B.; Mahmooduzzafar. y Iqbal, M. 2004. Plant growth, stomatal response, pigments and photosynthesis of *Althea officinalis* as affected by SO<sub>2</sub> stress. *Indian Journal of Plant Physiology*. (9): 224-233.

- Zaller, J. G.; Saccania, F. y Frank, T. 2011. Effects of earthworms and mycorrhizal fungi on the growth of the medicinal herb *Calendula officinalis* (Asteraceae). *Plant Soil Environment*. 57 (11): 499-504.
- Zubek, S.; Stefanowicz, A. M.; Błaszowski, J.; Niklińska, M. y Seidler-Łożykowska, K. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil microbial communities under contrasting fertilization of three medicinal plants. *Applied soil Ecology*. (59): 106-115.

## CAPITULO VI

### Anexos

#### 6.1. Preparación de solución nutritiva

##### 6.1.a. Solución nutritiva Jensen

Componente	Cantidad
Ca HPO <sub>4</sub> (Fosfato de calcio dibásico)	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fosfato de potasio dibásico polvo)	0.2 g
Mg SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sulfato de magnesio hepta hidratado)	0.2 g
Na Cl (Cloruro de sodio)	0.2 g
Fe Cl <sub>3</sub> (Cloruro de hierro)	0.1 g
<b>Micronutrientes</b>	<b>1 mL</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Ácido bórico)	0.5 g
Zn SO <sub>4</sub> (Sulfato de cinc)	0.05 g
Mn SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (Sulfato de manganeso monohidratado)	0.5 g
Cu SO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O (Sulfato de cobre pentahidratado)	0.05 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (Molibdato de sodio hidratado)	0.05 g

## 6.2. Preparación de soluciones

### 6.2.a. Hidróxido de potasio (KOH)

Componente	Cantidad
KOH 100 g	100 g
Agua destilada	1000 mL

**Procedimiento.** Pesar 100 g de KOH y aforar a 1000 mL de agua destilada, agitar a hasta disolver bien el KOH, guardar a temperatura ambiente.

### 6.2.b. Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10%

Componente	Cantidad
Peróxido de hidrógeno	100 mL
Agua destilada	1000 mL

**Procedimiento.** Medir en probeta graduada 100 mL de (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y aforar en 1000 mL de agua destilada. Agitar y guardar a temperatura ambiente.

### 6.2.c. Ácido clorhídrico (HCl) al 10%

Componente	Cantidad
Ácido clorhídrico	100 mL
Agua destilada	1000 mL

**Procedimiento.** Medir 100 mL de (HCl) en probeta graduada y aforar en 1000 mL de agua destilada. Agitar y guardar a temperatura ambiente.

#### 6.2.d. Azul tripano 0.05% en lactoglicerol

Componente	Cantidad
Azul de tripano	0.5 g ó 500 mg
Lactoglicerol	1000 mL

**Procedimiento.** Pesar 0.5 g de azul tripano y agregar 1000 mL de lactoglicerol y agitar hasta disolver bien el colorante, guardar a temperatura ambiente.

#### 6.2.e. Lactoglicerol

Componente	Cantidad
Ácido láctico	500 mL
Glicerina	500 mL
Agua destilada	500 mL

**Procedimiento.** Agregar los tres componentes en partes iguales, en el orden de la tabla.

#### 6.2.f. Acetona 90%

Componente	Cantidad
Acetona	45 mL
Agua destilada	1000 mL

**Procedimiento.** Agregar los 45 mL de acetona en un litro de agua destilada y guardar a temperatura ambiente.