



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**PRODUCCIÓN DE INOCULANTE MICORRÍZICO DE DOS GÉNEROS
FÚNGICOS ARBUSCULARES CONSIDERANDO TAMAÑO DE PARTÍCULA Y
MEZCLAS DE SUSTRATOS**

ARTURO JIMÉNEZ MARTÍNEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: PRODUCCIÓN DE INOCULANTE MICORRÍZICO DE DOS GÉNEROS FÚNGICOS ARBUSCULARES CONSIDERANDO TAMAÑO DE PARTÍCULA Y MEZCLAS DE SUSTRATOS, realizada por el alumno Arturo Jiménez Martínez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



Dra. Ma. del Carmen Ángeles González Chávez

ASESORA:



Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena

ASESORA:



M en C. María Encarnación Lara Hernández

ASESOR:



Dr. José Luis García Cue

Montecillo, Texcoco. México abril 2013

PRODUCCIÓN DE INOCULANTE MICORRÍZICO DE DOS GÉNEROS FÚNGICOS ARBUSCULARES CONSIDERANDO TAMAÑO DE PARTÍCULA Y MEZCLAS DE SUSTRATOS

Arturo Jiménez Martínez, M.C.
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2013

Para la producción de inoculante se probaron dos hongos en mezclas de sustratos y tamaños de partícula se realizaron dos experimentos. En el primero, para la producción de *Gi. gigantea* se probaron dos tipos de bonote de coco: granular (Bg) y fibroso (Bf) en mezcla con piedra pómez (P) y tezontle (T), con tres tamaños de partícula (< 0.6 mm, 0.6-1 mm, 1-2 mm) en proporción 3:1 v/v, Adicionalmente, se probó una mezcla Bg:P:T, 6:1:1 v/v de 1-2 mm y una mezcla con turba: agrolita: vermiculita (Tur:A:T) a granel, 2:1:1v/v como tratamiento testigo. Se utilizó lechuga como planta hospedera. A los 75 días después de la siembra (dds), los sustratos que favorecieron mayor colonización micorrízica fueron: Tur:A:V, Bg:P:T 1-2 mm y los sustratos de granulometría de 0.6-1 mm. El mayor número de esporas (20 esporas g⁻¹ sustrato seco) se obtuvo en Tur:A:V. El estudio micromorfológico mostró que en el sustrato Tur:A:V, las esporas se distribuyeron en poros de empaquetamiento complejo (PEC), mientras que en Bg:P:T además de PEC, se localizaron en las vesículas fracturadas de tezontle. En el segundo experimento, los sustratos que se emplearon para la producción de inoculantes de *Gi. gigantea* y *Funneliformis mosseae* fueron Bg:P:T y Tur:A:V (1-2 mm) y lechuga como planta hospedera. Se usaron sensores de humedad *in situ* (80 dds) y se calculó la actividad de estructuras micorrízicas internas con tinción vital. La producción de esporas fue similar entre los diferentes tratamientos pero en Bg:P:T fue donde se encontró el mayor número de *Gi. gigantea* (0.43 g⁻¹ de sustrato seco), además, demandaron agua en forma más continua en comparación que las colonizadas por *F. mosseae*. Esto último podría deberse a que dichas mezclas y tamaños de partículas aunque no favorecieron la producción de esporas, mantuvieron las estructuras intrarradicales activas. La producción de inoculante no se relacionó con la efectividad en la planta hospedera en mezclas de sustratos, por lo que es necesario determinar las condiciones de temperatura, humedad y granulometría en las cuales la producción de esporas puede estimularse.

MYCORRHIZAL INOCULUM PRODUCTION OF TWO ARBUSCULAR FUNGAL GENUS CONSIDERING PARTICLE SIZE AND SUBSTRATES MIXTURE

Arturo Jiménez Martínez, M. Sc.
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2013

In order to produce mycorrhizal inoculum two greenhouse experiments were carried out using different growing media and mixtures of particle sizes. The first one, *Gigaspora gigantea* were tested using coconut fiber (Cf) and granular (Cg) mixed with pumice (P) and volcanic scoria (Vs), with three particle sizes (<0.6 mm, 0.6-1 mm, 1 - 2 mm), and 3:1 ratio v/v. Also we use others mixtures of Cg:P:Vs, 6:1:1 v / v of 1-2 mm and a mixture of peat moss: agrolite: vermiculite (Pm:A:V) in bulk material, 2:1:1 v/v as control treatment. Lettuce was used as a host plant. At 75 days after planting (DAP), the growing media that favored greater mycorrhizal colonization were: Pm:A:V, Cg:P:Vs 1-2 mm mixture and 0.6-1 mm particle size. The higher number of spores (20 spores g⁻¹ dry substrate) was obtained in Pm:A:V. Micromorphological analysis showed that in Pm:A:V mixture, the spores are located on complex packing voids (PPV), where the air capacity and water retention were suitable for their developing, while in Cg:P:Vs. Moreover than PPV the spores were localized in the external vesicles of volcanic scoria where the water was stored. In the second experiment, the production of inoculant of *Gi. gigantea* and *Funneliformis mosseae* was evaluated using mixtures of Cg:P:Vs and Pm:A:V (1-2 mm) and lettuce as host plant. Moisture sensors *in situ* were used in each treatment (80 DAP) and the activity of the internal mycorrhizal structures was calculated with vital staining technique. Our finding showed that the inoculum mycorrhizal are related with the mixtures and water retention. The spores production was similar between treatments but in Cg:P:Vs had the higher number of *Gi. gigantea* (0.43 g⁻¹ dry substrate) and the greater water consumption; in contrast with plants colonized by *F. mosseae*. The latter, the mixture and particle size limited the development spores production although active intraradical structures were remained. We conclude that mycorrhizal inoculum production was not associated with the host plant effectiveness in different growing media; therefore, it is necessary to determine the temperature, granulometry and humidity conditions in which spore production can be stimulated.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados y especialmente al área de Edafología, por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Agradezco profundamente el apoyo que se me brindo de manera incondicional por parte de los miembros de mi Consejo Particular en el desarrollo de la Investigación y elaboración del manuscrito: Dra. Ma. del Carmen Ángeles González Chávez, Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena, Dr. José Luís García Cue y M. C. María Encarnación Lara Hernández. A todos y cada uno de ustedes, profesores y amigos, muchas gracias.

A los Dres. Rogelio Carrillo y Carlos Ortiz por brindarme su amistad y conocimientos para la elaboración del presente trabajo.

A los M. C. Patricio Sánchez, Jaime Cruz, Enrique Suástegui, Luis Pineda, Alicia Franco y Jorge Valdez por su amistad y apoyo brindado durante el proceso de investigación y elaboración del manuscrito.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5: Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal, por facilitarme los sensores de retención de humedad, para esta investigación.

Al personal del Laboratorio de Química de Suelos y Laboratorio de Génesis, Morfología y Clasificación de suelos por su apoyo, amistad, por compartir conmigo el sagrado alimento y buenos momentos.

A mis compañeros y Amigos: Ariadna Sánchez, Alejandro Ruiz, Alma Cuellar, David A. Moreno, Víctor M. Duarte, Eliceo Quisehuatl, Mariana T. Vázquez, Juan Carlos Castro, Giovana Rivera, Tania González, Dulce Alonso, J. Pablo Gutú, Stefani Perea, J. Alfredo Noguez, Miriam A. Martínez, Ma. Isabel Hernández, Alonso Muñoz, Eréndira Carmona, Oswaldo Osuna. Por su incondicional amistad, por estar conmigo en los instantes precisos. A todos y cada uno de ustedes muchísimas gracias hermanitos, por su cariño.

DEDICATORIA

Con gratitud y amor para con las siguientes personas

A la memoria de mis padres:

Biól. Aurora Martínez Vara

Dr. Epifanio Jiménez Ávila

“...Les evoco en mi sentir
porque han sido la tea que ilumina
cada centímetro del porvenir
que me acecha,
el fuego vigilante en la penumbra...

desde ayer
y hasta entonces

esperaré a encontrarles” (Jiménez-Martínez A. 1998. Sangre)

A mi Querido Hermano Leonardo

Compañero, guerrero de múltiples batallas, poeta y amigo, por permitirme estar en tu corazón, palabra, mente y espíritu.

A Alejandra Juárez Mondragón

Por hacerme partícipe
de la caricia del viento matutino,
bajo tu fragancia suave
en el azul intenso
de estos cielos.

Por la caída de estrellas
en el manto de la noche.
Por tu beso sagrado y dulce
donde mis labios
reconocen su nicho.

Por tu abrazo y cotidiana sonrisa,
¿Cómo puedo no amarte
si te he visto nacer
donde no creí reconocerte? (Jiménez-Martínez A. 2013. Naturaleza)

A mis queridos hermanos Adrianita C. Flores, Alicia Bautista y Felipe Ortiz

A la memoria de mis Profesores y Amigos caídos: Dr. León F. Cintra Mc.Glone, M. C. José Castillo Tovar y Biól. Miguel Flores Cruz.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN GENERAL.....	I
ABSTRACT.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1.1 Micorriza arbuscular	1
1.1.2 Estructuras de los hongos micorrízico arbusculares	2
1.1.3 Producción de inoculantes micorrizicos	3
1.1.4 Control de calidad de inoculantes	8
1.2 Sustratos	10
1.2.1 Propiedades físicas	11
1.2.2 Propiedades químicas.....	13
1.3 Importancia del tamaño de partícula en sustratos para el desarrollo de plantas de interés agrícola y ornamental	14
1.4 Importancia del tamaño de partícula en sustratos y su interacción con hongos micorrízico arbusculares	15
1.5 Conclusión de la revisión	17
1.6 Objetivo general	17
1.6.1 Objetivos particulares.....	17
1.7 Hipótesis general.....	17
1.8 Bibliografía	18

CAPÍTULO 2. PRODUCCIÓN DE INOCULANTE MICORRÍZICO DE <i>Gigaspora gigantea</i> EN MEZCLAS DE SUSTRATOS Y TAMAÑOS DE PARTÍCULA.....	25
Resumen.....	25
2.1. Introducción.....	25

2.2 Objetivo general	27
2.2.1 Objetivos particulares	27
2.3 Hipótesis general.....	28
2.3.1 Hipótesis particulares	28
2.3.1.1 La producción de esporas se afecta con la morfología de los materiales orgánicos en mezclas con pómez y tezontle.....	28
2.4 Materiales y métodos	28
2.4.1 Establecimiento del experimento.....	28
2.4.2 Análisis físico y químico de los sustratos	29
2.4.2.1 Densidad aparente (Da)	29
2.4.2.2 Densidad real (Dr)	30
2.4.2.3 Espacio poroso total.....	30
2.4.2.4 Curva de retención de humedad	30
2.4.3 Variables de respuesta a evaluar de la planta hospedera.....	31
2.4.3.1 Porcentaje de la colonización micorrízica.....	31
2.4.3.2 Número de esporas por sustrato	32
2.4.3.3 Peso seco de parte aérea y raíz.....	32
2.4.3.4 Volumen radical.....	32
2.4.4 Análisis micromorfológico de la interacción sustrato-raíz-HMA.....	32
2.4.4.1 Secciones delgadas	32
2.4.4.2 Análisis de imágenes	33
2.4.5 Análisis de datos	33
2.5 Resultados	34
2.5.1 Colonización micorrízica y número de esporas en los sustratos probados	34
2.5.2 Peso seco de la parte aérea.....	35

2.5.3	Peso seco de la raíz.....	35
2.5.4	Volumen radical.....	39
2.5.5	Propiedades físicas y químicas de los sustratos probados	41
2.5.5.1	Análisis de los sustratos experimentales.....	41
2.5.5.2	Curvas de retención de humedad	41
2.5.6	Análisis micromorfológico de los sustratos no inoculados e inoculados con <i>Gigaspora gigantea</i> a los 75 días después de la siembra.....	41
2.6	Discusión.....	49
2.7	Conclusiones.....	52
2.8	Bibliografía	53
CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE <i>Gigaspora gigantea</i> Y <i>Funnelformis mosseae</i> CON PLÁNTULAS DE LECHUGA EN DOS TIPOS DE SUSTRATOS.....		
	Resumen	56
3.1	Introducción.....	57
3.2	Objetivo general	57
3.2.1	Objetivos particulares	58
3.3	Hipótesis general.....	58
3.3.1	Hipótesis particulares	58
3.4	Materiales y métodos	58
3.4.1	Establecimiento del experimento.....	58
3.4.2	Variables de respuesta a evaluar	59
3.4.2.1	Tinción vital	59
3.4.2.2	Análisis de datos	60
3.5	Resultados	60
3.5.1	Variables de respuesta de la planta hospedera	60
3.5.1.1	Porcentaje de colonización micorrízica	60

3.5.1.4	Peso seco de la raíz.....	63
3.5.1.5	Volumen radical.....	63
3.5.2	Propiedades físicas y químicas de los sustratos.....	65
3.5.2.1	Dinámica de temperatura en sustratos durante el desarrollo de plantas de lechuga.....	66
3.5.2.2	Cinética de demanda de agua en sustratos durante el desarrollo de plántulas de lechuga.....	67
3.6	Discusión.....	71
3.7	Conclusiones.....	74
3.8	Bibliografía	74
4	CONSIDERACIONES FINALES	77
4.1	Discusión general.....	77
4.2	Conclusiones y recomendaciones generales	78
4.3	Bibliografía	79
	Anexos	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Producción de inoculante micorrízico en suelo	5
Figura 1.2. Producción de inoculante micorrízico en hidroponía	6
Figura 1.3. Producción de inoculante micorrízico en aeroponía.....	7
Figura 1.4. Producción de inoculante micorrízico <i>in vitro</i>	8
Figura 2.1. Equipo para determinación de la curva de retención de humedad en sustratos que se sometieron a tensiones de 10, 50 y 100 kpa.....	31
Figura 2.2 Porcentaje de colonización micorrízica en plántulas de lechuga inoculadas con <i>Gigaspora gigantea</i> en los sustratos.	36
Figura 2.3 Arbúsculos y micelio intrarradical en raíces de lechuga colonizadas por <i>Gigaspora gigantea</i> en los sustratos Bg:P:T 1-2 mm y Tur.A:V a granel.	36
Figura 2.4 Número de esporas de <i>Gigaspora gigantea</i> en los sustratos probados....	37
Figura 2.5. Peso seco de la parte aérea de plántulas de lechuga del tratamiento no inoculado en los sustratos probados.....	38
Figura 2.6 Peso seco de la parte aérea de plántulas de lechuga del tratamiento de inoculación con <i>Gigaspora gigantea</i> en los sustratos probados..	38
Figura 2.7. Peso seco de la raíz de plántulas de lechuga del tratamiento no inoculado en los sustratos probados..	39
Figura 2.8. Peso seco de la raíz de plántulas de lechuga del tratamiento inoculado con <i>Gigaspora gigantea</i> en los sustratos probados..	39
Figura 2.9. Volumen radical de plántulas de lechuga del tratamiento no inoculado en los sustratos probados.	40
Figura 2.10. Volumen radical de plántulas de lechuga del tratamiento inoculado con <i>Gigaspora gigantea</i> , en los sustratos probados..	40
Figura 2.11: Capacidad de retención de humedad en sustratos de granulometría < 0.6 mm a diferentes tensiones después de 24 h.....	42

Figura 2.12. Capacidad de retención de humedad en sustratos de granulometría de 0.6- 1 mm a diferentes tensiones después de 24 h.....	43
Figura 2.13. Capacidad de retención de humedad en sustratos de granulometría mayor 1-2 mm a diferentes tensiones después de 24 h.....	43
Figura 2.14. Distribución de partículas de los sustratos no inoculados.....	45
Figura 2.15. Distribución en secciones delgadas de partículas de los sustratos inoculados con <i>Gigaspora gigantea</i> con granulometría de 1-2 mm..	46
Figura 2.16. Distribución de partículas de los sustratos inoculados con <i>Gigaspora gigantea</i> con granulometría de < 0.6 mm.....	47
Figura 2.17. Distribución de partículas de los sustratos inoculados con <i>Gigaspora gigantea</i> con granulometría de 0.6-1 mm.....	47
Figura 2.18. Distribución en secciones delgadas de partículas del sustrato Tur:A:V a granel.....	48
Figura 2.19. Secciones delgadas que muestran a) esporas de <i>Gigaspora gigantea</i> entre los poros de empaquetamiento complejo de los sustratos Tur:A:V a granel y Bg:P:T 1-2 mm	48
Figura 2.20. Secciones delgadas que muestran esporas de <i>Gigaspora gigantea</i> relacionadas con poros vesícula fracturados de partículas de tezontle en Bg:P:T 1-2 mm.....	49
Figura 3.1. Porcentaje de colonización total y vital de los HMA probados en sustratos.....	61
Figura 3.2 Colonización micorrízica de <i>Gigaspora gigantea</i> y <i>Funneliformis mosseae</i> en raíces de lechuga en Bg:P:T y Tur:A:V	62
Figura 3.3. Número de esporas en los tratamientos de inoculación, en los sustratos probados.....	62
Figura 3.4. Peso seco de la parte aérea de plantas de lechuga de los tratamientos de inoculación en los sustratos.....	63

Figura 3.5 Peso seco de la raíz de plantas de lechuga de los tratamientos de inoculación.	64
Figura 3.6. Volumen radical de plantas de lechuga de los tratamientos de inoculación en los sustratos probados.	64
Figura 3.7 Desarrollo de raíces de lechuga en los tratamientos de inoculación en los sustratos con granulometría 1-2 mm.....	65
Figura 3.8 Fluctuación diaria de la temperatura de los sustratos durante el desarrollo del experimento.....	66
Figura 3.9 Capacidad de retención de humedad de los sustratos probados a diferentes tensiones después de 24 h.....	67
Figura 3.10. Demanda de agua de plantas de lechuga no micorrizadas en Tur:A:V..	68
Figura 3.11. Demanda de agua de plantas de lechuga no micorrizadas en el sustrato Bg:P:T.	68
Figura 3.12. Demanda de agua de plantas de lechuga inoculadas con <i>Funneliformis mosseae</i> en Tur:A:V.....	69
Figura 3.13. Demanda de agua de plantas de lechuga en Bg:P:T del tratamiento inoculado con <i>Funneliformis mosseae</i>	69
Figura 3.14. Demanda de agua de plantas de lechuga en Tur:A:V del tratamiento inoculado con <i>Gigaspora gigantea</i>	70
Figura 3.15. Demanda de agua de plantas de lechuga inoculadas con <i>Gigaspora gigantea</i> en el sustrato Bg:P:T.	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Características físicas y químicas de los sustratos probados	42
Cuadro 2.2 Porosidad total en mezclas de sustratos no inoculados en secciones delgadas	44
Cuadro 2.3. Porosidad total en mezclas de sustratos inoculados con <i>Gigaspora gigantea</i> en secciones delgadas.....	46
Cuadro 3.1. Propiedades físicas y químicas de los sustratos utilizados.....	65

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Micorriza arbuscular

El término micorriza (hongo-raíz) se acuñó en 1885, para describir la asociación simbiótica que ocurre entre la mayoría de las plantas terrestres con cierto grupo de hongos (Allen, 1996). Aunque hay diferentes tipos de asociación micorrízica, la micorriza arbuscular es la que se encuentra en la mayoría de los ecosistemas terrestres, así como en los agroecosistemas (Feldmann *et al.*, 1989).

En esta simbiosis, ambos organismos (planta y hongo) se benefician (Allen y Allen, 1984). Por un lado, el hongo obtiene de la asociación fotosintatos que la planta le provee, además de un nicho para desarrollarse y protegerse. Por otro lado, estos hongos pueden mejorar la nutrición mineral de la planta como P, Cu, Zn, N, Mn, S y Fe (Smith y Read, 1997), debido a que las hifas tienen mayor capacidad que las raíces para explorar el suelo (Friese y Allen, 1991). En consecuencia a través de estas estructuras micorrízicas se establece un vínculo más estrecho entre la planta y el suelo (Gianinazzi *et al.*, 1990; Blanco y Salas, 1997).

Se presume que 85% de las especies vegetales descritas se encuentran colonizadas por hongos micorrízico arbusculares (HMA). Estos hongos al asociarse con las raíces de sus plantas hospederas son capaces de completar su ciclo de vida (Miller *et al.*, 2002); ya que son biotrofos obligados; esto es, que necesitan de la planta hospedera para sobrevivir y reproducirse (Smith y Read, 1997).

La planta colonizada también adquiere mayor resistencia a condiciones de estrés ambiental, como por ejemplo: déficit de agua (Clark y Zeto, 2000), tolerancia a agentes fitopatógenos (Newshan *et al.*, 1995), así como a altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos (González-Chávez *et al.*, 2004). Además de estimular la pronta floración, reducción en la aplicación de fertilizantes químicos y plaguicidas en los suelos para cultivo (Regvar *et al.*, 2003; Russomanno *et al.*, 2008), lo que propicia mayor productividad en las plantas (Allen *et al.*, 1984; van der Heijden *et al.*, 1998; Suresh y Bagyaraj, 2002).

1.1.2 Estructuras de los hongos micorrízico arbusculares

Los hongos micorrízico arbusculares son simbioses obligados de las plantas y se ubican taxonómicamente dentro del Phylum Glomeromycota. A la fecha existen cuatro órdenes, 11 familias, 17 géneros y 228 especies, de los cuales *Glomus* es el más abundante y ampliamente distribuido (Schüßler *et al.*, 2001; Schüßler y Walker, 2010)

El proceso de colonización en la mayoría de los géneros formadores de micorriza inicia cuando la hifa penetra y se desarrolla en la zona intersticial de las células corticales de la raíz. Posteriormente, hay diferenciación y se forman las estructuras fúngicas características, como son: los arbusculos, vesículas e hifas intrarradicales (Allen, 1996).

Al exterior de la raíz se forman redes hifales (micelio externo o extrarradical), esporas, así como una estructura ramificada absorbente o "BAS" por sus siglas en inglés (Branched Absorbing Structure; Bago *et al.*, 1998) y en el caso específico de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, células auxiliares (Bianciotto y Bonfante, 1999).

La estructura fúngica ramificada dentro de las células corticales de la raíz hospedera es el arbusculo. Esta estructura es el punto de contacto e intercambio de recursos energéticos entre los simbioses involucrados (Cox y Tinker, 1976). La fuente energética son compuestos carbonados transferidos por parte de la planta (fotosintatos) hacia el hongo y de nutrientes minerales entre el HMA desde su micelio extrarradical hacia la raíz colonizada (Allen, 1996).

Las vesículas son las estructuras que contienen a los lípidos y se consideran como la fuente energética de reserva (Mosse, 1973). En los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no se forman vesículas, pero si células auxiliares. Éstas son grupos de células ricas en núcleos y organelos arregladas a manera de racimo (8-16 células), y mantenidas por una hifa extrarradical corta. Sin embargo; aún no hay evidencia de que las vesículas estén funcionalmente sustituidas por las células auxiliares, de manera que se desconoce el significado biológico de estas estructuras (Bianciotto y Bonfante, 1999).

Las esporas son estructuras de resistencia y reproducción, las cuales al germinar (propiciado por el alargamiento de la hifa de germinación) dan lugar a la

colonización de la raíz hospedera. La morfología de las esporas maduras ha sido la principal característica en la taxonomía clásica de estos microorganismos para ser ubicados a nivel de género y especie (Elmes y Mosse, 1984; Varela-Fregoso y Trejo, 2001).

El micelio, es el conjunto de hifas, capaz de explorar al suelo o sustrato, más allá del alcance de la raíz para absorber agua, minerales poco solubles o menos móviles como: P, Cu y Zn, y mejorar la nutrición del vegetal al que el hongo se encuentra asociado (Harley y Smith, 1983). La red micelial es componente esencial en el proceso de los ciclos biogeoquímicos (Barea y Jeffries, 1995), además se involucra en la formación de los agregados del suelo, a través de la producción de glomalina (Wright y Upadhyaya, 1999).

La glomalina es una glicoproteína producida por el micelio extrarradical, la cual está fuertemente correlacionada con la estabilidad de estos agregados. Se menciona que ésta actúa como pegamento natural entre las partículas asociadas y materia orgánica. Lo anterior facilita la aireación y drenaje del suelo, la disponibilidad de los minerales, además propicia hábitat para otros microorganismos del suelo, y optimiza el crecimiento y desarrollo de la planta hospedera (Wright y Upadhyaya, 1998).

1.1.3 Producción de inoculantes micorrizicos

El manejo adecuado de la relación suelo-planta-HMA es un enfoque promisorio para el aprovechamiento biotecnológico en la productividad y sustentabilidad de los agroecosistemas (Varela-Fregoso y Trejo, 2001). Esto se debe a que las comunidades de hongos micorrízico arbusculares, en los ecosistemas terrestres, intervienen en la diversidad, composición y sucesión vegetal (Gange *et al.*, 1990), en el balance hídrico (Augé, 2001), habilidad competitiva y sobrevivencia (Allen y Allen, 1990), así como en la producción de biomasa y en la fijación de carbono (Thomson *et al.*, 1990). Adicionalmente en los agroecosistemas propician notables mejoras en productividad y en la absorción de nutrientes poco disponibles (van der Heijden *et al.*, 1998).

Las plantas requieren la reintroducción de especies micorrízicas eficientes en escenarios donde existen suelos erosionados o altamente degradados por

procesos naturales o como consecuencia de actividades humanas, donde se propicia la ausencia o bajas poblaciones de HMA nativos y donde especies micorrízicas no son del todo eficientes. Así como en los viveros donde el sustrato se fumiga, vaporiza o esteriliza y la flora microbiana se elimina por la presencia de nematodos, hongos o bacterias fitopatógenas (González-Chávez, 2002).

La producción de inoculante tiene como objetivo la multiplicación de los HMA a través de la utilización de diferentes tipos de propágulos para colonizar nuevas raíces, como son las esporas, el micelio extrarradical y los segmentos de raíces colonizadas, en la mayoría de los géneros de los HMA (Friese y Allen, 1991).

De manera general, todos los métodos de propagación de los HMA comienzan con el aislamiento de esporas del suelo de alguna localidad específica o de alguna colección que ya se tenga y que sólo se necesite multiplicar a los hongos de interés. Los inóculos, según sea el objetivo a perseguir, pueden ser de una sola especie, o bien de un consorcio. Las soluciones nutritivas a utilizar para el mantenimiento de las plantas deben contener baja concentración de P, para propiciar pronta y abundante colonización y esporulación por parte del HMA (Jarstfer y Sylvia, 1999).

Para la propagación en macetas (Figura 1.1) se utilizan esporas, raíces colonizadas y micelio extrarradical. Estos propágulos se colocan en recipientes con sustrato estéril, el cual puede estar compuesto por vermiculita, perlita, arena o suelo (o mezclas entre algunos de estos componentes). Las semillas a utilizar pueden germinarse o no, antes de colocarlas en la maceta de propagación. Las plantas se riegan con agua de la llave o periódicamente con soluciones nutritivas; esto depende de los materiales de los que esté constituido el sustrato. Después de tres meses el riego se suspende y se realiza la cosecha de raíces, hifas y esporas obtenidas (Sylvia y Jarstfer, 1994). Los HMA de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, las principales fuentes de inoculante son las esporas (Klironomos y Hart, 2002)



Figura 1.1 Producción de inoculante micorrízico en suelo

Este método de propagación es sencillo y de bajo costo; sin embargo, posee alto riesgo de contaminación por ingreso de microorganismos patógenos si no se tiene el suficiente cuidado en la manipulación o en su almacenamiento (Gianinazzi y Vosátka, 2004). En ocasiones, la cantidad de propágulos obtenidos en el inóculo resultante es menor de lo esperado debido a las características físicas o químicas del sustrato que se utiliza, el cual no favorece el proceso de la colonización micorrízica (Corkidi *et al.*, 2005). Por lo cual, se requieren sustratos que contribuyan en el establecimiento de abundante sistema radical, así como en la multiplicación y obtención de propágulos infectivos por unidad de volumen o peso (González-Chávez, 2002).

La técnica hidropónica (Figura 1.2) es otra forma de obtención de inoculante. Existen por lo menos dos maneras de poder hacerlo. La primera, se le conoce como técnica de película nutritiva, en la cual las raíces de plantas previamente colonizadas (en sustratos como perlita o arena) crecen en cámaras donde las sumergen permanentemente en una solución nutritiva. Dicha solución fluye rápida

y continuamente entre las raíces para permitir el intercambio de gases, nutriéndolas a través de una capa fina (Hawkins y George, 1997).



Figura 1.2. Producción de inoculante micorrízico en hidroponía

La siguiente alternativa se conoce como sistema de flujo, que a diferencia de la primera, utiliza arcilas expansivas como sustrato e inundación periódica de sus raíces (Dehne y Backhaus, 1986). En Ambas técnicas hidropónicas favorecen la formación de propágulos y facilita su cosecha. Sin embargo el riesgo de contaminación por otros hongos y protozoarios, es alto, además del costo elevado que implica la instalación del sistema.

Otra manera de producción de inóculo es el cultivo aeropónico (Figura 1.3); en el cual, al igual que en el caso anterior, se necesita de la pre-inoculación de las raíces en sustrato. Posteriormente, las plántulas se colocan en una cámara aeropónica sin sustrato. En este método de propagación, la aplicación de la solución nutritiva en las raíces es a través de la aspersion. Entre 12 a 15 semanas posteriores, es posible realizar la cosecha (Jarstfer y Sylvia, 1999). Este método permite la obtención de abundante de micelio y esporas con poco riesgo de

contaminación; sin embargo, es un sistema tecnológicamente complejo (Gianinazzi y Vosátka, 2004).

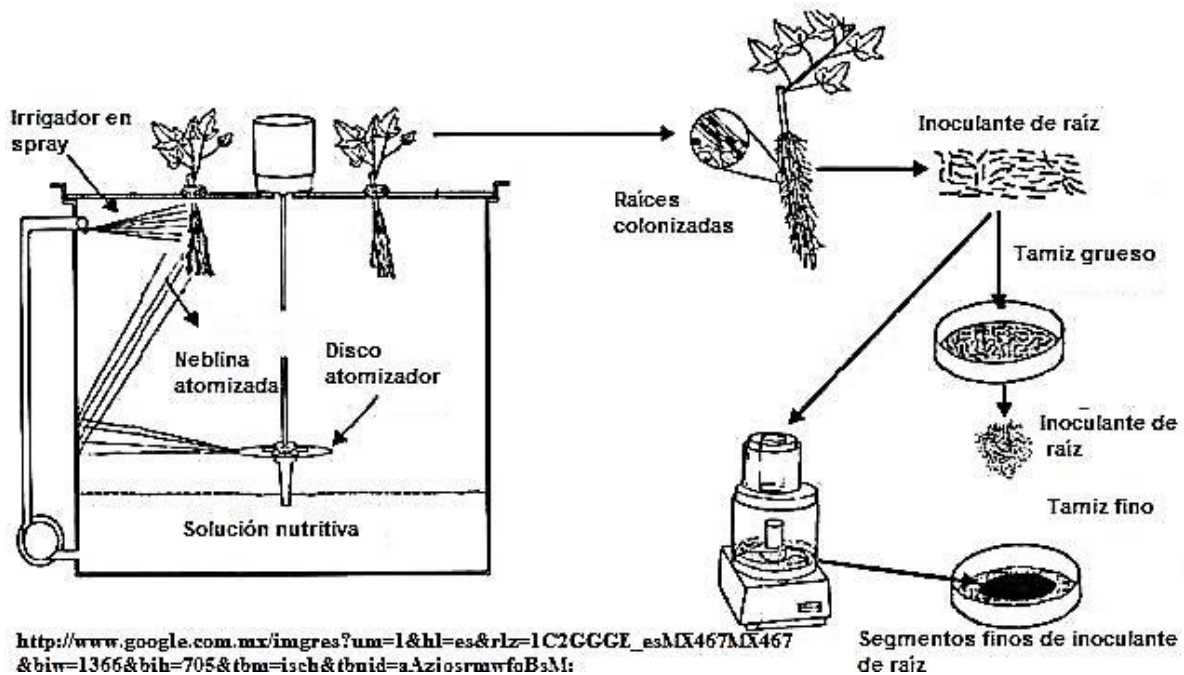


Figura 1.3. Producción de inoculante micorrízico en aeroponía

En el caso del método de propagación *in vitro* (Figura 1.4), después de seleccionar las esporas que se desean propagar, hay que desinfectarlas superficialmente con antibióticos. Debido a que estos microorganismos son simbioses obligados, requieren la presencia de una raíz; en este caso se utiliza una raíz transformada (a consecuencia de la infección con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, misma que le confiere la capacidad de crecer en ausencia de la parte aérea). Es necesaria la utilización de un medio de cultivo específico (medio M) para que la raíz y los HMA puedan desarrollarse en estas condiciones (Bécard y Fortín, 1988). Después de realizar la siembra en el medio M, las cajas de Petri se incuban en condiciones de oscuridad a 25 °C. A partir de los dos a cuatro meses posteriores, es posible obtener abundante cantidad de raíces colonizadas, además de gran número de esporas e hifas (Fortín *et al.*, 2002). Esta manera de propagación tiene numerosas desventajas: debe realizarse en condiciones estériles (de preferencia en una campana de flujo laminar), el riesgo de contaminación por bacterias y otros hongos es alto, no todos los HMA tienen la capacidad de desarrollarse bajo estas

condiciones, la infraestructura requerida es costosa, además de los reactivos que se necesitan para la elaboración del medio M.



Figura 1.4. Producción de inoculante micorrízico *in vitro*

1.1.4 Control de calidad de inoculantes

La base de producción de inoculantes de alta calidad está en el entendimiento de los principios biológicos de los HMA (Feldmann *et al.*, 1989). La actividad industrial en cuanto a la producción de inóculo, se desarrolla utilizando diferentes HMA, los cuales en la mayoría de los casos no les caracterizan en términos de sus requerimientos ecológicos. La falta de control de calidad en diferentes mercados está entre las principales razones para aceptar poco la tecnología de la micorriza en prácticas de agricultura y horticultura. Se requiere conocimiento en términos de su eco-fisiología para lograr la eficiente manipulación de tales microorganismos (Gianinazzi y Vosátka, 2004); también se reporta que no todos los hongos formadores de micorriza arbuscular, son funcionalmente compatibles con todas las plantas hospederas (Corkidi *et al.*, 2005). Además, en condiciones de campo, la introducción de nuevos HMA puede traer como consecuencia la alteración en

estructura de las comunidades nativas por efecto de competencia (Callaway y Walter, 1997).

Para los inoculantes hechos con base en HMA, los requerimientos de control de calidad son infectividad, efectividad, concentración, pureza, ausencia de patógenos y vida en anaquel, al igual que para cualquier otro tipo de inoculante microbiano (González-Chávez, 2002).

La infectividad de propágulos se refiere a la capacidad que tengan los hongos para colonizar y formar la asociación micorrízica en presencia de diversos factores ambientales como luz, temperatura, pH y nutrimentos del suelo (Tarbell y Koske, 2007). El término infectividad también se conoce como la tasa de colonización micorrízica (Corkidi *et al.*, 2005). La efectividad se define como la capacidad de los HMA para incrementar el crecimiento y absorción de nutrimentos así como a la tolerancia a las condiciones ambientales adversas (Clark y Zeto, 2000; Newsham *et al.*, 1995; González-Chávez *et al.*, 2004). La concentración es la cantidad de propágulos de potencial infectivo obtenidos en poco volumen de sustrato en el tiempo de cosecha. En la mayoría de los géneros HMA, estos son principalmente segmentos de raíces colonizadas, hifas y esporas, con excepción de *Gigaspora* y *Scutellospora* donde sólo son esporas (Klironomos y Hart, 2002; Gianinazzi y Vosátka, 2004). Pureza del inóculo, se refiere a la ausencia de microorganismos no deseados que pudieran propagarse y tener un riesgo fitopatógeno en las plantas de propagación. Se recomienda desinfección superficial de esporas y raíces que nos servirán como inóculo, así como de las macetas de propagación y el cuidadoso manejo y empaquetamiento en tiempo de cosecha del inóculo obtenido.

Para asegurar la sanidad del inoculante obtenido se requieren análisis diversos tales como: siembra en medios selectivos de crecimiento para descartar la presencia de hongos, bacterias y actinomicetos fitopatógenos, o bien tamizados del sustrato en el caso de nematodos (Gianinazzi y Vosátka, 2004; González-Chávez, 2002). Vida de anaquel, hace referencia a la preservación de la viabilidad del inoculante obtenido en condiciones de almacenamiento, para lo cual se recomienda mantenerlo en condiciones óptimas de aeración, baja humedad y temperatura de 4 °C (González-Chávez, 2002).

Los principales factores que influyen la producción de inoculante micorrízico son: la planta hospedera, especie fúngica, soluciones nutritivas, condiciones ambientales, así como el tipo de sustrato (propiedades físicas).

1.2 Sustratos

Sustrato se define como el material sólido diferente del suelo, mineral u orgánico, de forma pura o en mezcla, que tiene función de anclaje del sistema radical de la planta y puede o no, intervenir en el proceso de nutrición de ésta (Noguera *et al.*, 1997). Entre las características físicas de mayor importancia de un sustrato se encuentran: capacidad de retención de humedad, distribución homogénea de tamaño de partículas, densidad aparente y real, estructura estable, porosidad total (Bosa *et al.*, 2003; Zanetti *et al.*, 2003). Las características químicas de mayor interés son: capacidad de intercambio catiónico, sales solubles, capacidad para mantener el pH, capacidad mínima del sustrato para descomponerse. Además, es relevante la resistencia a cambios extremos, químicos, físicos y ambientales (Rodríguez-Díaz, 2004). Cuando el sustrato no cumple con las necesidades nutricionales de las plantas, es necesaria la fertilización; constituida por incorporación de solución nutritiva u otros insumos. La adición de estos nutrimentos cuya composición estará en función de la demanda de la planta y de su eficiencia para convertir en biomasa los nutrimentos absorbidos (Nomura *et al.*, 2008).

Existen diferentes criterios de clasificación de los sustratos, basados en el origen de sus materiales, su naturaleza, sus propiedades, capacidad de agregación, etc. De acuerdo con sus propiedades, los sustratos químicamente inertes como: arena, tezontle, roca volcánica, perlita y arcilla expandible actúan como soporte de la planta y no intervienen en los procesos de fijación de nutrimentos. Por otra parte, los sustratos químicamente activos como: turba, corteza de pino y vermiculita se comportan como depósitos de reserva de nutrimentos aportados mediante la fertilización. Las diferencias entre estos tipos de sustrato están determinadas, por la capacidad de intercambio catiónico, así como la de almacenamiento de nutrimentos (Noguera *et al.*, 1997).

Otra clasificación toma en consideración el origen de los materiales que constituyen al sustrato inorgánico. Los minerales naturales de origen diverso como rocas y otros, sufren ligeras o nulas modificaciones: arena, grava, tierra volcánica. Los sustratos transformados se constituyen a partir de tratamientos complejos (físicos o químicos) que modifican notablemente las características de las rocas u otros minerales de origen. Ejemplos de éstos son: lana de roca, perlita, arcilla expandida, vermiculita, entre otros. Sustratos a partir de residuos o subproductos; procedentes de distintas actividades industriales pueden ser: escorias de alto horno, estériles de carbón y ladrillo molido (Abad, 1995).

Otro tipo de materiales útiles para utilizarlos como sustratos son los materiales orgánicos. Los de origen natural se caracterizan por estar expuestos al proceso de descomposición biológica: turbas rubias y negras. De síntesis, como polímeros orgánicos no biodegradables que se obtienen mediante síntesis química: espuma de poliuretano, espuma de urea-formaldehído, poliestileno expandido. Subproductos y residuos de actividades agrícolas, industriales y urbanas. Como por ejemplo, pajas de cereales, estiércoles, cortezas de árboles, aserrín, fibra de madera, fibra de coco, residuos sólidos urbanos, lodos de depuración de aguas residuales, muchos de los cuales deben someterse previamente a un proceso de compostaje antes de ser empleados como sustratos (Abad, 1995).

1.2.1 Propiedades físicas

La caracterización física estudia la distribución del material sólido, el agua y el aire, así como la variación en función del potencial matricial (Abad, 1995). Varias son las propiedades de interés que se consideran al seleccionar los sustratos, tales como: espacio poroso total, capacidad de campo, capacidad de aireación, distribución y el tamaño de las partículas, densidad aparente y real (Zanetti *et al.*, 2003; Anicua-Sánchez *et al.* 2009)

Espacio poroso, es el volumen de un suelo o sustrato no ocupado por partículas orgánicas o minerales, según Bullock *et al.* (1985), dependiendo de sus características éstos se dividen en: poros de empaquetamiento simple, compuesto y complejo, vesículas y fisuras.

Los poros de empaquetamiento simple son equi-dimensionales y alargados, están presentes entre partículas de granos simples, poseen permeabilidad alta y no tienen capacidad de retener agua o nutrientes. Los poros de empaquetamiento compuesto, además de ser equi-dimensionales, alargados e interconectados en un porcentaje alto, están presentes entre agregados esferoidales (granular o migajoso), son de origen biológico, con abundantes microporos y son permanentes. Tienen capacidad para retener agua y nutrientes.

Los poros de empaquetamiento complejo se encuentran entre agregados de tamaño diverso, constituidos por minerales y materiales orgánicos; son permanentes y continuos con alta permeabilidad. En tanto que los poros vesículas se forman debido al secuestro de O_2 y CO_2 , tienen forma esferoidal, no conectadas entre sí, lo que impide el movimiento del agua; no tienen capacidad para almacenarla, pero sí para drenarla. Finalmente, los poros fisura no son permanentes y continuos; a nivel macro son conocidos como grietas y a nivel micro, como fisuras.

Capacidad de campo (cc) se define como la diferencia entre el volumen de agua que permanece el sustrato, después de saturarlo con agua y dejarlo drenar durante cierto tiempo. Refiriéndose también, como el contenido máximo de agua que puede retener el suelo o sustrato cuando la mayoría de sus macroporos está ocupada por aire (Porta-Casarellas *et al.*, 2003; Ansorena, 1994). La cc puede también estar influenciada por la textura y estructura, cantidad de materia orgánica, entre otros factores (Fabian y Ottoni-Filho, 2000).

El punto de marchitez permanente se define como el contenido de agua por debajo del cual, las plantas no son capaces de extraerla del suelo. Correspondiendo así, al límite inferior de agua retenida por fuerzas capilares absorbible por sus raíces (Porta-Casarellas *et al.*, 2003). Capacidad de aireación (ca) es la proporción del volumen del sustrato que contiene aire después de saturarlo con agua y dejarlo drenar. El nivel óptimo de la capacidad de aireación oscila entre 20 y 30% en volumen. La distribución y tamaño de los poros es el factor clave en el estado hídrico y de aireación de los sustratos (Raviv *et al.*, 2002).

La distribución y tamaño de las partículas de un sustrato (granulometría), así como su composición mineral y orgánica, determinan su función en el crecimiento de las plantas, mediante la geometría interna, porosidad, interacciones entre fluidos y solutos, los cuales establecen el balance entre el contenido de agua y el aire (Abad, 1995). La fase sólida del sustrato está compuesta por partículas de distintos tamaños y formas, así como también, componentes amorfos (materia orgánica) (Raviv *et al.*, 2002). La distribución y el tamaño de las partículas son propiedades importantes que informa de la calidad física del sustrato y la adecuación para determinada especie vegetal, lo cual influye de manera determinante en el volumen de aire y de agua retenida por el sustrato. Las partículas de diámetro mayor (dependiendo del tipo de sustrato) son las responsables de la formación de poros grandes (macroporos), ocupados por aire y las de menor diámetro determinan la formación de microporos, encargados de retener agua (Zanetti *et al.*, 2003).

Densidad aparente (D_a) se define como la masa seca del material sólido por unidad de volumen del medio húmedo, es decir incluyendo el espacio poroso entre las partículas. La D_a aporta información sobre la compactación en los sustratos así como de cada horizonte en el suelo. Los sustratos cuando están compuestos por más de un solo componente, contribuyen a la D_a total en conjunto, lo que determina, el arreglo combinado en la distribución de sus partículas y su dinámica de compactación. Esto a su vez, permite inferir sobre las dificultades del enraizamiento y la circulación del agua y aire (Raviv *et al.*, 2002; Porta-Casarellas *et al.*, 2003). Densidad real (D_r) se define como el cociente entre el volumen de las partículas constituyentes de un sustrato y el volumen que ocupan sin considerar su porosidad (Ansorena, 1994).

1.2.2 Propiedades químicas

Las propiedades químicas caracterizan la transferencia de moléculas entre el sustrato y su fase líquida a través de reacciones de disolución e hidrólisis, intercambio de iones y biodegradación de la materia orgánica (Abad, 1995). Salinidad se refiere a la concentración de sales solubles en el sustrato, está expresada en g L^{-1} o puede medirse por la conductividad eléctrica en la solución

(Lemaire, 1995). El pH se define como el logaritmo negativo de la concentración de los iones H^+ en el suelo o alguna solución (Russell y Larena, 1990). Esta propiedad química ejerce efectos principales sobre la descomposición de la materia orgánica, disponibilidad y asimilación de los nutrientes, capacidad de intercambio catiónico, actividad microbiana (hongos y bacterias), así como en el comportamiento y crecimiento de las plantas (Porta-Casarellas *et al.*, 2003).

1.3 Importancia del tamaño de partícula en sustratos para el desarrollo de plantas de interés agrícola y ornamental

Los sustratos tienen diferentes tamaños de partículas, esta característica se relaciona principalmente al origen de sus componentes, sistema de colecta y a la serie de procesos a los que éste es sometido antes de utilizarlo como medio para cultivo de plantas. Las propiedades físicas de los sustratos están determinadas por el tamaño y la forma de sus partículas; las cuales definen el tipo de porosidad con la formación de empaques simples, cavidades, fisuras y vesículas. Asimismo el tamaño, número y ubicación de los poros influyen en la capacidad de retención y movimiento del agua en los sustratos (Anicua-Sánchez *et al.*, 2009). Anicua-Sánchez (2008) observó que las plantas de *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)* presentaron mayor desarrollo radical en los sustratos: bonote de coco, turba, tezontle, piedra pómez y perlita, con granulometría homogénea de 1 mm que las obtenidas de sustratos agranel. Las plantas presentaron mayor desarrollo radical en comparación con los sustratos a granel.

Hernández-Escobar (2009) reportó que para el desarrollo de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* Var. Summertime), en mezclas de sustratos de bonote de coco granular (Bg) con tezontle (T) o piedra pómez (P) (75:25 v/v) y granulometría de 1-2 mm, el porcentaje de germinación, peso seco, desarrollo y distribución de la raíz fueron mayores que el tratamiento testigo (Turba). También encontró que la capacidad de retención de humedad fue mayor en Bg:T y Bg:P que en el tratamiento testigo. Esto pudo deberse a la naturaleza, tamaño de partícula homogéneo y forma de las partículas en los materiales utilizados.

1.4 Importancia del tamaño de partícula en sustratos y su interacción con hongos micorrízico arbusculares

Según Saif (1981), el sustrato ideal para la propagación de HMA debe permitir el establecimiento funcional de la simbiosis micorrízica y ayudar a la provisión de agua y aire para el crecimiento de los simbiontes involucrados. Con base en las evidencias de Anicua-Sánchez (2008) y Hernández-Escobar (2009), el tamaño de partícula es factor determinante para el desarrollo de la parte radical, pero probablemente lo sea también para la máxima expresión de los propágulos micorrízicos en la producción de inoculante.

Los sustratos empleados en la propagación de HMA se componen de materiales de diferente naturaleza, destacando entre los más comunes arena, turba (Jakobsen *et al.*, 1992; Corkidi *et al.*, 2005; Tarbell y Koske, 2007), perlita, vermiculita (Dehne y Backhaus, 1986; Hawkins y George, 1997), arcillas expansivas (Jarstfer y Sylvia, 1999), diversos residuos forestales (Douds *et al.*, 2010), tezontle, fibra de coco (Guzmán-Plazola *et al.*, 1990) y residuos de caña de azúcar (Carneiro *et al.*, 2008). Estos sustratos se emplean solos o en mezclas en la mayoría de los casos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se manejan los productos a granel. Existen pocos estudios en los que reportan la influencia del tamaño de partícula en la producción de inóculo micorrízico.

La arena ha sido un sustrato adecuado para la propagación de HMA pero debido a su manejo se dificulta. Por tanto, siguen los esfuerzos en la búsqueda de nuevos sustratos los cuales, además de que sean ligeros, de bajo costo, con alta disponibilidad, favorezcan la propagación de los HMA (González-Chávez *et al.*, 2000; González-Chávez, 2002).

Gaur y Andholeya (2000), compararon el efecto del tamaño de partícula de arena (1.70-0.78 mm, 0.50-0.78 mm, 0.50-0.25 mm y < 0.25 mm) en la producción de esporas y porcentaje de colonización de *Rhizophagus intraradices* en plantas de maíz. Señalaron que en las partículas de mayor tamaño (0.78-1.70 mm) no se formaron tantos propágulos micorrízicos, debido posiblemente a menor capacidad de retención de agua en la arena con este tamaño de partícula. Estos autores obtuvieron la mayor producción de esporas y alto porcentaje de colonización en partículas con diámetro 0.50-0.78 mm. Atribuyeron el efecto a mayor aeración,

drenaje y suministro de O₂; los cuales propiciaron mayor crecimiento radical. También observaron que cuando aplicaron la solución nutritiva Hoagland sin P, incrementó la producción de esporas y la colonización, independientemente del tamaño de partícula en el sustrato. Sin embargo, los autores no mostraron evidencia de análisis químico ni físico del sustrato que se utilizó, y que explicara la falta de P adicional.

Drew *et al.* (2003) investigaron cómo la longitud y el diámetro hifal de *R. intraradices* y *F. mosseae*, al colonizar plantas de *Trifolium subterraneum*, se modificaron en arena, la cual tuvo diferentes tamaños de partícula (0.10, 0.38 y 0.26 mm). Los autores observaron que no hubo diferencia en la cantidad en hifas externas de *F. mosseae* entre los tres tamaños de partícula del sustrato, mientras que con *R. intraradices* se produjo mayor cantidad de hifas externas en el sustrato de 0.10 mm de tamaño de partícula. Sin embargo, ambos hongos crecieron más rápidamente en el sustrato con 0.10 mm de tamaño de partícula y más lento en sustrato de 0.38 mm. Además, los autores también observaron que el diámetro de las hifas de los hongos se incrementó con la reducción del espacio poroso, presentando menor cantidad de hifas ramificadas. En el caso de las arenas compuestas por cuarzo, el empaquetamiento de las mismas es siempre igual, lo cual facilita la percolación del agua.

Ridgway *et al.* (2006) analizaron nueve mezclas: arena sílica (0.5-1 mm y 1-1.4 mm), piedra pómez (0.5-1 mm y 1-1.4 mm), arena sílica: piedra pómez (0.5-1 mm) en proporción 70:30 v/v. Arena sílica: piedra pómez (1-1.4 mm) en proporción 50:50 v/v; arena sílica: aserrín: piedra pómez (4:1 v/v) con tamaño de partícula de 0.5-1 mm y 1-1.4 mm en proporción 50:50 y la mezcla aserrín: piedra pómez 4:1 v/v a granel. Los sustratos fueron inoculados con 2.5 g de un producto comercial (Vaminoc™) el cual contenía esporas y segmentos de raíces colonizadas de tres especies no identificadas de HMA del género *Glomus* en arcilla. Se utilizaron plantas de vid para este experimento. Los resultados mostraron que después de cinco meses en la mezcla arena sílica: piedra pómez 0.5-1 mm (70:30 v/v) se encontró el mayor número de esporas en 1.70 mL⁻¹ de sustrato.

1.5 Conclusión de la revisión

Los estudios de materiales que ofrezcan nuevas alternativas en la elaboración de sustratos de bajo costo, que reduzcan la presión de explotación sobre recursos naturales, y que coadyuven al crecimiento vegetal y a la producción de inoculante micorrízico, son indispensables. En este sentido, para cada sustrato es necesario conocer y evaluar algunas de sus propiedades físicas y químicas así como realizar estudios micromorfológicos que muestren evidencia de la relación intrínseca entre estas propiedades, el desarrollo de raíz, establecimiento de la simbiosis micorrízica y formación de esporas y con lo anterior será posible seleccionar adecuadamente sustratos para este propósito. Por otro lado, se requiere conocer la influencia del tamaño de partícula de los sustratos en la capacidad de los propágulos infectivos de los HMA de diferente género para el establecimiento de la simbiosis y la producción de esporas, bajo condiciones ambientales en que la simbiosis se instaure.

Con base en lo anterior se plantearon los siguientes objetivo e hipótesis generales y particulares

1.6 Objetivo general

Producir inoculante micorrízico de dos géneros fúngicos arbusculares mediante la selección de sustratos con diferente granulometría en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* var. King Herry) bajo condiciones de invernadero.

1.6.1 Objetivos particulares

1.6.1.1 Analizar la producción de esporas de *Gi. gigantea* con plántulas de lechuga en sustratos orgánicos con diferente granulometría en condiciones de invernadero.

1.6.1.2 Comparar la producción de esporas de las especies *Gi. gigantea* y *Funneliformis mosseae* en dos tipos de sustratos de la misma granulometría en el desarrollo de plántulas de lechuga en condiciones de invernadero.

1.7 Hipótesis general

La producción de inoculante micorrízico de dos géneros fúngicos arbusculares está influida por sustratos con diferente granulometría en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* var. King Herry) bajo condiciones de invernadero.

1.8 Bibliografía

- Abad, M.E. 1995. Sustratos para el cultivo sin suelo. In: El Cultivo del Tomate. Nuez, F. (ed.). Mundi-Prensa. Barcelona, España. pp: 133-166.
- Abbott, L.K. y A.D. Robson. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agric. Ecosyst. Environ.* 35:121-150.
- Allen, M.F. 1996. The Ecology of Arbuscular Mycorrhizas: A look back into the 20th century and a peek into the 21st. *Mycol. Res.* 7: 769-782.
- Allen, E.B. y M.F. Allen. 1990. The mediation of competition by mycorrhizae in successional and patchy environments. In: *Perspectives on Plant Competition*. Grace, J.B y D. Tilman (eds.). Academic Press, San Diego. pp: 367-390.
- Allen, M.F., E.B. Allen y P. Stahl. 1984. Differential niche response of *Bouteloua gracilis* and *Paspopyrum smithii* to VA mycorrhizae. *Bull. Torrey Bot. Club.* 111: 361- 365.
- Anicua-Sánchez R., M.C. Gutiérrez-Castorena, P. Sánchez-García, C. Ortiz-Solorio, V.H. Volke y J.E. Rubiños-Panta. 2009. Tamaño de partícula y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y zeolita. *Agric. Téc. Méx.* 35: 147-156.
- Arenas, N. y Vavrina, C.S. 2002. Coir as alternative to peat in media for tomato transplant production. *Hort Sci.* 37: 309-312.
- Ansorena, M.J. 1994. Sustratos, Propiedades y Caracterización. Mundi Prensa Madrid. España. pp: 172.
- Augé, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- Bago, B. y C. Cano. 2005. Breaking myths on arbuscular mycorrhizas *in vitro* biology. In: *In vitro Culture of Mycorrhizas*. Declerck, S., D.G. Strullu., J.A. Fortin (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp:111-138.
- Bago, B., C. Azcón-Aguilar A. Goulet y Y. Piche. 1998. Branched absorbing structures: A feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New. Phytol.* 139: 375-388.
- Bécard, G. y A. Fortin. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Bianciotto, V. y P. Bofante. 1999. Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi. In *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Varma, A. y B. Hock (eds). 2^a edition. Springer-Verlag .Berlin Heidelberg- New York. pp: 229-251.

- Blanco, F.F. y E. Salas. 1997. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agro. Costarricense* 21: 55-67.
- Biermann, B. y R. G. Linderman. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol.* 95:97-105.
- Boddington, C.L. y J.C.Dodd. 1998. Comparison of techniques for the extraction and quantification of extra-radical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in soils. *Soil Biol. Biochem.* 31:479-482.
- Bosa, N., E.O. Calvete., V.A. Klein y M. Zuzin. 2003. Crescimento de mudas de gipsofila em diferentes substratos. *Hort. Bras.* 21: 514-519.
- Bullock, P. N., A. Federoff., G. Jongerius., Stoops, y T. Tursina, 1985. Handbook for Soil Thin Section Description. Wayne Research Publications, England. pp. 207.
- Callaway, R.M. y Walter L.R. 1997. Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology.* 78: 1958-1965.
- Carneiro, V.R.F., M.A. Martins., M.M.S Freitas., E. Detmann. y H.M. Vasquez. 2008. Bagaço de cana-de-açúcar como substrato para multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares e sua influência sub estilosantes. *Catinga* 5:189-196.
- Chabot, S., G. Becard. y Y. Piche. 1992. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84: 315-321.
- Chaurasia, B. y P.K. Khare. 2005. *Hordeum vulgare*: A suitable host for mass production of arbuscular mycorrhizal fungi from natural soil. *App. Ecol. Environ. Res.* 4: 45-53.
- Clark, R.B. 1997. Arbuscular mycorrhiza adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant Soil* 92: 15-22.
- Clark, R.B. y S. K. Zeto. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J. Plant Nutrition* 23: 867-902.
- Corkidi, L.E., B. Allen, D. Merhaut, M.F. Allen, J. Downer, J. Bohn y M. Evans. 2005. Effectiveness of commercial mycorrhizal inoculants on the growth of *Liquidambar styraciflua* in plant nursery conditions. *J. Environ. Hort.* 23: 72-76.
- Cox, G. y P.B. Tinker. 1976. Translocation and transfer of nutrients in vesicular arbuscular mycorrhizas. The arbuscule and phosphorus transfer' a quantitative ultrastructural study. *New Phytol.* 77: 371-378.
- Declerck S., S. Séguin. y Y. Dalpe. 2005. The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for germoplasm collections. In: *In vitro* Culture of

- Mycorrhizas. Declerck S., D.G. Strullu. y J.A. Fortin (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp:111-138.
- Declerck, S., D.G. Strullu. y C. Plenchette.1996. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. Mycol. Res. 100: 1237–1242.
- Dehne, H.W. y G.F. Backhaus.1986. The use of vesicular-arbuscular fungi in plant production. I. Inoculum production. Z Pflanzenkrankh Pflanzenschutz 93: 415-424.
- Douds, D.D., G. Nagahashi. y P.H. Reed. 2010. On-farm production of inoculum of indigenous arbuscular micorrhizal fungi and assessment of diluents of compost for inoculum production. Bioresour. Technol. 101: 23 26-2330.
- Drew, E. A., R. S Murray y S. E. Smith. 2003: Beyond the rhizosphere: growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes. Plant Soil. 251: 105-114.
- Elmes R.P. y B. Mosse. 1984. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production, experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. Can. J. Bot. 62: 1531–1536.
- Fabian, A.J. y E.T.B. Ottoni-Filho. 2000. Determinação de capacidade de campo *in situ* a través de equações de regressão. Pesq. Agro. Bras. 5: 1029-1036.
- Feldmann, F., N.T.V Junqueira y R. Lieberei. 1989. Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhiza as a factor of integrated plant protection. Agric. Ecosyst. Environ. 29: 131-135.
- Feng, G., F.S. Zhang., X.L. Li., C. Y- Tian., C. Tang. y Z. Rengel. 2002. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. Mycorrhiza 12: 185-190.
- Fischer, C.R., D.P. Janos., D.A. Perry., R.G. Linderman. y P. Sollins 1994. Mycorrhiza inoculum potentials in tropical secondary succession. Biotropica 26: 369-377.
- Fortin, A., G. Bécard, S. Declerck., Y. Dalp., M. St-Arnaud, A. Coughla. y Y.Piche. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-cultures. Can. Bot. Assoc. 80: 1-20.
- Friese, C.F. y M.F. Allen. 1991. The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil; inoculum types and external hyphal architecture. Mycologia 83: 409-418.
- Gange, A.C., K.B. Brown y L.M. Farmer. 1990. A test of mycorrhizal benefit in an early successional plant community. New Phytol. 115: 85-91.
- Gaur, A y A. Andholeya. 2000. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. Mycorrhiza 10: 43-48.

- Gianinazzi, S., V. Gianinazzi-Pearson y A. Trouvelot. 1990. Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. In: Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth. Whipps, J.M., B. Lumsden (eds.). Cambridge University Press. Cambridge. pp: 41-54.
- Gianinazzi, S y M. Vosátka. 2004. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. Can. J. Bot. 82: 1264-1271.
- González-Chávez, M.C., R. Ferrera-Cerrato., A. Villegas-Monter y J.L. Oropeza. 2000. Selección de sustratos de crecimiento en microplántulas de cítricos inoculados con *Glomus* sp. Zac-19. Terra Latinoamericana 18: 369-377.
- González-Chávez, M.C. 2002. Producción y control de calidad de inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares. In: Producción y Control de Calidad de Inoculantes Agrícolas y Forestales. Pérez-Moreno J, J. Alvarado López y R. Ferrera-Cerrato (eds.). Comité Mexicano de Inoculantes Agrícolas y Forestales; Colegio de Postgraduados. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias y Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Texcoco, estado de México. pp: 36-46.
- González-Chávez, M.C., R. Carrillo-González y S.F. Wright y K. Nichols. 2004. The rol of glomalin, protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi in sequestering potentially toxic elements. Environ. Pollut. 130: 317-323.
- Guzmán-Plazola, R.A., R. Ferrera-Cerrato., B.J..D. Etchervers y H.V. Volke. 1990. Biotecnología de la producción de inóculo micorrízico v-a. Agrociencia, Serie agua-suelo-clima 3: 155-181.
- Harley, J.L. y S.E. Smith. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London. pp: 483.
- Hawkins, J.H. y E. George. 1997. Hydroponic culture of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* with *Linum usitatissimum*, L., *Sorghum bicolor* L. and *Triticum aestivum* L. Plant Soil 196: 143-149.
- Hernandez-Escobar, J.L. 2009. Propiedades hídricas en mezclas de sustratos con diferentes proporciones y tamaños de partícula. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco. México. pp.81.
- Howard, M.R. 1991. Hydroponic Food Production: A Definitive Guidebook of Soilless Food Growing Methods. Howard, M.R. (ed.). 4a. Ed. California: Woodbridge. pp: 462.
- Hung, L-L. y D.M. Sylvia 1988. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. Appl. Environ. Microbiol. 54: 353-357.
- INVAM. 1993. Properties of infective propagules at the suborder level (Glomineae versus Gigasporineae). INVAM Newsletter 3: September.

- Jakobsen, I., L.K. Abbott y A.D. Robson. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol.* 120: 371-380.
- Jarstfer, A. y D. Sylvia. 1998. Aeroponic Culture of VAM Fungi. In: *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Varma A. y Hock (eds.). 2^{da} Edition. Bertelsman Springer Publishing Groups. Germany. pp:427-440.
- Klironomos, N.J. y M.M. Hart. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12: 181-184.
- Lemaire, F. 1995. Physical, chemical and biological properties of growing medium. *Act. Hort.* 396: 273-284
- Liu, R.-J y X.-S.Lou. 1994. A new method to quantify the inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 128: 89-92.
- Miller, R.M., S.P. Miller., J.D Jastrow y C.B. Rivetta. 2002. Mycorrhizal mediated feedbacks influence net carbon gain and nutrient uptake in *Andropogon gerardii*. *New Phytol.* 155: 149-162
- Mohammad, A., A.G. Khan y C. Kuek. 2002. Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9: 337-330.
- Mosse, B. 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Ann. Rev. Phyto.* 2: 171-196.
- Newsham, K.K., A.H. Fitter y A.R. Watkinson. 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends Ecol. Evol.* 10: 407-411.
- Noguera, P., M. Abad, P. Ruchades, V. Noguera, A. Maquieira y J. Martínez. 1997. Physical and chemical properties of corrí waste and their relation to plant growth. *Acta Hort.* 450: 365-374.
- Noguera, P., M. Abad., R. Puchades., A. Maquieira y V.Noguera, 2003. Influence of particle Size on Physical and chemical properties of coconut coir dust as container medium. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 34: 593-605.
- Nomura, E.S., J.D. Lima, V.A. García y D.S. Rodrigues. 2008. Crescimento de mudas micropropagadas da bananeira cv. Naricão, em diferentes substratos e fontes de fertilizantes. *Acta Scientiarum Agronomy.* 30: 359-363.
- Porta-Casarellas, J., M. López-Acevedo y C. Roquero. 2003. *Edafología, para la Agricultura*. 3^a edición. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona. España. pp. 801.
- Quesada-Roldan G. y Méndez-Soto C. 2005. Evaluación de sustratos para almácigos de hortalizas. *Agronomía Mesoamericana* 16: 171-183.

- Raviv, R.M., R. Wallach, A. Silber y A. Bar-Tal. 2002. Substrates and their analysis. In: Hydroponic production of vegetables and ornamentals. Sawas, D., H. Passam (eds.). Embryo Publications. Athens, Greece. pp: 25-101.
- Regvar, M., K. Vogel-Mikuš y T. Ševerkar. 2003. Effect of AMF inoculum from field isolates on the yield of green pepper, parsley, carrot, and tomato. *Folia geobotanica* 38: 223-234.
- Ridgway, H.J., J. Kandula y A. Stewart. 2006. Optimising the medium for producing arbuscular mycorrhizal spores and the effect of inoculation on grapevine growth. *N. Z. Plant Prot.* 59: 338-342.
- Rodríguez-Díaz, E. 2004. Caracterización física de los sustratos. Memorias del VI Congreso Iberoamericano para el desarrollo y la aplicación de plásticos en Agricultura. Bogotá, Colombia. pp. 221.
- Russomanno, O.M.R., P.C. Kruppa y M.T.A. Minihoni. 2008. Influência de fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de plantas de Alecrime manjeriço. *Arquivos do Instituto Biológico.* 7: 37-43.
- Saif, S.R. 1981. The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular arbuscular mycorrhizas. I. Effect of soil oxygen on the growth and mineral uptake of *Eupatorium odoratum* L. Inoculated with *Glomus macrocarpus*. *New Phitol.* 88: 649-659.
- Schüßler A. y C. Walker. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester, UK. 1- 56.
- Schüßler, A., D. Schwarzott y C. Walker. 2001. A new fungal Phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Re.* 105: 1413-1421.
- Sharma, A.K., C. Singh y P. Akhauri. 2000. Mass culture of arbuscular mycorrhizal fungi and their role in biotechnology. *Indian natn. Sci. Acad.* 66: 223-238.
- Smith, S.E. y Read D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbioses.* 2da. edition. Academic Press, London. pp. 605.
- Skipper, H.D. y Smith GW. 1979. Influence of soil pH on the soybean-endomycorrhiza symbiosis. *Plant Soil* 53: 559-563.
- St-Arnaud, M., C. Hamel., B. Vimard., M. Caron. y J.A. Fortin. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol. Res.* 100: 328-32.
- Sylvia, D.M. y A.G. Jarstfer. 1994. Production of inoculum and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. In: *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry.* Robson, A.D., Abbott, L.K. y Malajezuk, N. (eds.) Kluwer, Dordrecht. pp: 231-238.

- Suresh, C.K. y D.J. Bagyaraj. 2002. Mycorrhiza-microbe Interface:Effect on Rhizosphere. *In*: Sharma, A.K. y B.N. Johri (Eds.). Arbuscular Mycorrhizae. Scientific Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. pp.7-28.
- Tajini, F., P. Suriyakup., H.J. Jansa y J. Drevon. 2009. Assess suitability of hydroaeronic culture to establish tripartite symbiosis between different AMF species, beans, and rhizobia. *BMC Plant Biol.* 9: 1-11.
- Tarbell, T.J. y R.E. Koske. 2007. Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inocula in sand/peat medium. *Mycorrhiza* 18: 51-56.
- Thomson, B.D., A.D. Robson y L.K. Abbott 1990. Mycorrhizas formed by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* on subterranean clover in relation to soluble carbohydrate concentrations in roots. *New Phytol.* 114: 217-225.
- van der Heijden, M.G.A., A.T. Boller, Wiemken y I.R. Sanders. 1998. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology.* 79: 2082-2091.
- Varela-Fregoso L. y D. Trejo. 2001. Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zool. Mex.* 1: 39-51.
- Wright, S.F. y A. Upadhyaya. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* 98: 97- 107.
- Wright, S.F. y A. Upadhyaya.1999. Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza.* 8: 283-285.
- Wu, C-G., Y-S. Liu. y L-L. Hung. 1995. Spore development of *Entrophospora kentinensis* in an aeroponic system. *Mycologia* 87: 582-587.
- Zanetti, M., C. Fernandes., J.O. Cazetta., J.E. Corá y J.D. Mattos. 2003. Características físicas de substratos para a produção de mudas cítricas sob telado. *Laranja, Cordeiropolis.* 24: 519-530.
- Zobel, R.W., P. Tredici. y J.G. Torrey. 1976. Method for growing plants aeroponically. *Plant Phisiol.* 57: 344-346.

CAPÍTULO 2. PRODUCCIÓN DE INOCULANTE MICORRÍZICO DE *Gigaspora gigantea* EN MEZCLAS DE SUSTRATOS Y TAMAÑOS DE PARTÍCULA

Resumen

Para la producción de inoculante de *Gigaspora gigantea* se probaron dos tipos de bonote de coco: granular (Bg) y fibroso (Bf) en mezcla con piedra pómez (P) y tezontle (T), con tres granulometrías (< 0.6 mm, 0.6-1 mm, 1-2 mm) en proporción 3:1 v/v, con excepción de Bg:P y Bg:T (1-2 mm) los cuales constituyeron al sustrato Bg:P:T en proporción 6:1:1 v/v. Adicionalmente, como testigo se incluyó una mezcla con turba: agrolita: vermiculita a granel, con proporción 2:1:1 v/v como tratamiento testigo. A cada sustrato se le determinó: pH, conductividad eléctrica, espacio poroso total, densidad aparente y real, y curva de liberación de agua. Se utilizó *Lactuca sativa* var. King Herry como planta hospedera. A los 75 días después de la siembra y se evaluó porcentaje de colonización micorrízica, número de esporas, peso seco de la parte aérea y raíz, volumen radical. Asimismo, se hizo un estudio micromorfológico y análisis de imágenes para determinar la interacción entre sustrato-crecimiento de raíz- estructuras micorrízicas externas. Los sustratos que favorecieron mayor colonización micorrízica fueron: Tur:A:V a granel, Bg:P:T 1-2 mm y todos los sustratos de granulometría de 0.6-1 mm. El mayor número de esporas (20 esporas g⁻¹ sustrato seco) se obtuvo en Tur:A:V a granel. Los sustratos < 0.6 mm y 0.6-1 mm favorecieron el mayor peso seco de la parte aérea, raíz y volumen radical. El estudio micromorfológico mostró que en el sustrato Tur:A:V a granel, las esporas se asociaron a los poros de empaquetamiento complejo (PEC); mientras que en Bg:P:T, además de PEC, éstas se relacionaron con la superficie rugosa que dejan las vesículas fracturadas de tezontle. Los resultados muestran la importancia de la selección de sustratos para la producción de inoculante micorrízico con producción abundante de esporas, la cual necesariamente no se relaciona con la efectividad en la planta hospedera.

2.1. Introducción

Para propagar los HMA se utilizan como sustratos materiales de diferente naturaleza; entre los más comunes se encuentran: arena, turba (Jakobsen *et al.*,

1992; Corkidi *et al.*, 2005; Tarbell y Koske, 2007), perlita, vermiculita (Dehne y Backhaus, 1986; Hawkins y George, 1997), arcillas expansivas (Jarstfer y Sylvia, 1999), diversos residuos forestales (Douds *et al.*, 2010), y de caña de azúcar (Carneiro *et al.*, 2008). Todos ellos en forma individual o en mezcla con diferentes proporciones.

Según Saif (1981), el sustrato ideal para la propagación de HMA debe permitir el establecimiento funcional de la simbiosis micorrízica y ayudar a la provisión de agua y oxígeno para el crecimiento de los simbiontes involucrados. Adicionalmente estos deben de ser ligeros, de bajo costo y con alta disponibilidad (González-Chávez *et al.*, 2000; González-Chávez, 2002). Sin embargo, en estas investigaciones no reportan sus propiedades hídricas y los sustratos se manejan a granel, lo que incrementa la variabilidad, por lo que se recomienda considerar la granulometría en la elaboración de sustratos (Pineda-Marín, 2011).

Estudios relacionados con tamaño de partícula y producción de inoculante en materiales inorgánicos han sido llevados a cabo por Gaur y Andholeya (2000) y Drew *et al.* (2003), utilizando *R. intraradices* y *F. mosseae*, en plantas de maíz y trébol respectivamente, así como por Ridgway *et al.* (2006) con *Glomus* en plantas de vid. No obstante, no hay estudios donde se involucre materiales orgánicos o mezclas de sustratos con alta proporción de los mismos. El material más común es turba, el cual se utiliza ampliamente como sustrato en las primeras etapas de desarrollo de plantas ornamentales y hortalizas en condiciones de vivero e invernadero. Sin embargo, debido a su costo elevado por ser un sustrato que se importa, surge la necesidad de encontrar otros materiales que se produzcan localmente.

También se ha considerado utilizar como sustrato al bonote de coco, ya que este material ha sidopreciado en los últimos años como sustituto de la turba, debido a su estabilidad en las propiedades físicas y químicas para el cultivo de hortalizas y plantas ornamentales (Arenas y Vavrina, 2002; Quesada y Méndez, 2005).

En la utilización del bonote de coco para cultivos hortícolas, Noguera *et al.* (2003) y Pineda-Marín (2011) reportaron que el tamaño de partícula influye en las propiedades físicas y químicas del sustrato, y que esto, afecta de manera importante al cultivo de interés. Lo anterior se manifiesta en la disponibilidad de los

macro y micronutrientos presentes, lo que influye en el desarrollo de la parte radical (Anicua-Sánchez, 2008; Hernández-Escobar 2009), por lo que también tengan relación con la expresión de los propágulos micorrízicos en la producción de inoculante.

Gutiérrez-Castorena *et al.* (2011) reportaron que mezclas Bg:T y Bg:P (75:25 v/v) con granulometría 1-2 mm, presentaron la mayor capacidad de retención de humedad. Sus estudios micromorfológicos corroboraron la existencia un sistema de poros heterogéneo y una distribución en bandas, que permitieron percolación y retención de humedad óptima para el desarrollo de las plántulas de lechuga, expresada en las mejores variables respuesta y calidad del cepellón que el tratamiento testigo (turba).

Sin embargo, no se han realizado evaluaciones en los diferentes tipos de bonote de coco. El bonote fibroso (Bf) tiene origen distinto al bonote granular (Bg), aunque con frecuencia es considerado el mismo tipo de sustrato. Bf se obtiene de la parte gruesa del mesocarpio del fruto teniendo valor industrial, en tanto que Bg proviene de los residuos que quedan después de la extracción de la fibra (Noguera *et al.*, 2003). Debido a que su morfología es contrastante, se espera que tengan diferentes propiedades hídricas y por lo tanto influencia en la producción de inoculante.

2.2 Objetivo general

Analizar la producción de esporas de *Gi. gigantea* con plántulas de lechuga en sustratos orgánicos con diferente granulometría en condiciones de invernadero.

2.2.1 Objetivos particulares

2.2.1.1 Analizar producción de esporas de *Gi. gigantea* en sustratos elaborados con base en mezclas de dos tipos de bonote de coco, piedra pómez y tezontle, en tres tamaños de partícula y una mezcla comercial de turba, agrolita y vermiculita como con testigo.

2.2.1.2 Relacionar micromorfológicamente la colonización micorrízica con el desarrollo radical de plántulas de lechuga en las diferentes mezclas de sustratos.

2.2.1.3 Evaluar la producción de esporas de *Gi. gigantea* con la capacidad de retención de humedad en sustratos elaborados con dos tipos de bonote y diferente granulometría.

2.3 Hipótesis general

La producción de esporas de *Gi. gigantea* depende de la granulometría de los sustratos en mezcla.

2.3.1 Hipótesis particulares

2.3.1.1 La producción de esporas se afecta con la morfología de los materiales orgánicos en mezclas con pómez y tezontle.

2.3.1.2 La capacidad de retención de humedad influye en la producción de esporas de *Gi. gigantea* en los sustratos a probar.

2.4 Materiales y métodos

El tipo de investigación fue experimental, y se empleó el diseño completamente al azar (DCA). La población fue de semillas de lechuga peletizada (*Lactuca sativa* var. King Herry) en sustratos. La muestra se dispuso de la siguiente manera: se tuvieron dos experimentos; los cuales se estructuraron con el Diseño Completamente al Azar. En cada uno de estos se aplicaron 12 diferentes tratamientos con cuatro repeticiones, dando un total de 48 unidades experimentales. El tamaño de muestra fue 12 (tratamientos) X 4 (repeticiones) X 2 (experimentos) = 96 unidades experimentales.

2.4.1 Establecimiento del experimento

El inóculo micorrízico de *Gigaspora gigantea* se propagó en macetas utilizando sorgo (*Sorghum bicolor* L.) y cempasúchil enano (*Tagetes erecta* L.) como plantas hospederas y arena estéril como sustrato. Las plantas se regaron cada tercer día con solución nutritiva Hoagland baja en fósforo [20 µM]. El periodo de propagación del inoculante fue de agosto a octubre del 2010. Después de ese tiempo, las macetas se dejaron de regar durante tres meses para propiciar la esporulación de *Gi. gigantea*.

Los materiales que se utilizaron para la elaboración de los sustratos fueron: bonote de coco fibroso (Bf) y granular (Bg), piedra pómez (P) y tezontle (T). Las

mezclas Bf:T y Bf:P se establecieron en tres granulometrías (< 0.6 mm, 0.6-1 mm, 1-2 mm); en tanto que Bg:T y Bg:P fueron en < 0.6 mm y 0.6-1 mm. La proporción que se utilizó en las mezclas anteriores fue 3:1. La mezcla Bg:P:T se preparó con una granulometría de 1-2 mm y en proporción 6:1:1. Adicionalmente, como testigo se empleó la mezcla con turba a granel: (Tur), agrolita (A) y vermiculita (V), Tur:A:V en proporción 3:1:1.

Antes de establecer los experimentos, las mezclas se esterilizaron 1 h en una olla de presión marca Presto a 120 °C y 15 Lb. Se utilizaron semillas peletizadas de lechuga (*Lactuca sativa* var. King Herry). Se establecieron dos experimentos simultáneos, con los 12 sustratos anteriormente mencionados, que dieron lugar a 12 tratamientos con cuatro repeticiones. Ambos experimentos se analizaron bajo un diseño completamente al azar. Los experimentos se mantuvieron entre los meses de julio y octubre del 2011 en condiciones de invernadero (temperatura promedio de 21 °C e intensidad luminosa de 5820.055 W·cm⁻²) en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo.

En el experimento uno, cada tratamiento se inoculó con 40 ± 1 esporas de *Gi. gigantea*, en tanto que los tratamientos del experimento dos, no se inocularon (NI). En cada unidad experimental se sembró una semilla de lechuga, dando como resultado 48 semillas por experimento. Las plantas se regaron diariamente con solución nutritiva Hoagland baja en fósforo (20 µM) y se mantuvieron por 75 días en ambos experimentos. Las variables que se evaluaron en la planta fueron: peso seco de la parte aérea y raíz, volumen radical, porcentaje de colonización micorrízica y número de esporas.

2.4.2 Análisis físico y químico de los sustratos

En cada uno de los sustratos que se probaron, se analizaron propiedades físicas como: espacio poroso total, retención de humedad, densidad aparente (Da) y real (Dr) y químicas como: pH y conductividad eléctrica (CE).

2.4.2.1 Densidad aparente (Da)

Se colocaron entre 10 y 20 g de sustrato seco en una probeta de 250 mL (por triplicado) luego, se le dieron 30 golpes suaves, de arriba hacia abajo, sobre una

mesa para propiciar el acomodo uniforme del sustrato y el volumen que ocuparon las partículas. El cálculo que se utilizó para determinar esta propiedad física fue:

$$Da = \frac{\text{peso del sustrato}}{\text{volumen ocupado por sus partículas}} \quad (\text{Ansorena, 1994}).$$

2.4.2.2 Densidad real (Dr)

Los sustratos probados se deshidrataron en una estufa a 105 °C por 24 h, se tomaron entre 10 y 20 g (ps) de estos y se vaciaron en matraces aforados (100 mL) previamente pesados (pm). Se les adicionó agua destilada hasta cubrir las muestras y se dejaron reposar por 24 h.

Con el fin de expulsar el aire retenido entre las partículas de los sustratos en los matraces, estos se colocaron en baño María (100 °C) hasta que no se observaran burbujas. Posteriormente, se sumergieron en bandejas de agua fría para alcanzar temperatura ambiente y después con agua destilada se aforaron.

El peso del matraz aforado se registró nuevamente (pm). Adicionalmente, la densidad del agua destilada se calculó (da). Finalmente, los matraces se lavaron y aforaron con agua destilada para nuevamente pesarse (psa). El cálculo de esta propiedad física para cada sustrato se realizó por triplicado. La fórmula que se usó para calcular Da fue:

$$Dr = \frac{da (ps - pm)}{(ps - pm) - (psa - pa)} \quad (\text{Ansorena, 1994}).$$

2.4.2.3 Espacio poroso total

El espacio poroso total, se define como espacio de aire y agua, formado por la suma de agua fácil y difícilmente disponible y de reserva, así como la capacidad de aireación. Esta propiedad física se calculó con la siguiente fórmula:

$$EPT = 100 - \left(\frac{Da}{Dr} 100 \right) \quad (\text{Ansorena, 1994}).$$

2.4.2.4 Curva de retención de humedad

Se tomaron de cada sustrato seco 100 g, los cuales se saturaron por 24 h con agua destilada; posteriormente se vertieron en embudos de un sistema de succión y fueron sometidos a tensiones de 10, 50 y 100 kpa por 24 h (Figura 2.1). La capacidad de retención de humedad se calculó por diferencia de pesos entre los materiales que se utilizaron y los sustratos probados (de Boodt *et al.*, 1974)

2.4.3 Variables de respuesta a evaluar de la planta hospedera

2.4.3.1 Porcentaje de la colonización micorrízica

Mediante la técnica propuesta por Phillips y Hayman (1970), a los 75 dds se determinó el porcentaje de colonización micorrízica en las raíces de lechuga. Las raíces se obtuvieron mediante el tamizado de los sustratos probados; posteriormente éstas se lavaron con agua de la llave y se colocaron en tubos de ensayo, donde se les adicionó KOH 10%; 12 h después las raíces se lavaron con agua de la llave y se les adicionó H₂O₂ al 3%, para su clareo. Las raíces nuevamente se lavaron con agua de la llave y se les adicionó por un minuto HCl al 10%, luego éste fue decantado y se les agregó azul de tripano (0.05%) por 12 h para favorecer su tinción.



Figura 2.1. Equipo para determinación de la curva de retención de humedad en sustratos que se sometieron a tensiones de 10, 50 y 100 kpa con base en el diseño de Boodt *et al.*, 1974.

A continuación, las raíces se colocaron en portaobjetos y se observaron por unidad experimental 75 campos. El porcentaje de colonización se obtuvo por presencia-ausencia de estructuras micorrízicas en las raíces.

2.4.3.2 Número de esporas por sustrato

El número de esporas se determinó usando la técnica de tamizado húmedo propuesta por Gerdemann y Nicolson (1963). Se tomaron 20 g de muestra de cada sustrato inoculado con *Gi. gigantea*; las cuales se hidrataron con agua de la llave por 10 min, después éstas se agitaron manualmente por cinco minutos y se dejaron reposar por un minuto. Después de dicho tiempo se pasaron a través de dos tamices de 1 mm y 400 μm . El material obtenido en el tamiz con abertura de malla más fino se colectó y cuantificó el número de esporas utilizando un microscopio estereoscópico. Sin embargo, para corroborar que no hubiera esporas en el tamiz de 1 mm, lo que se obtuvo en éste, también se revisó.

2.4.3.3 Peso seco de parte aérea y raíz

La parte aérea y las raíces de lechuga se colocaron en bolsas de papel de estraza y se secaron en una estufa (VWR Scientific) a 75 °C hasta obtener peso constante. La parte aérea y las raíces se pesaron en una balanza analítica (ADP 3100L).

2.4.3.4 Volumen radical

Las plantas se cosecharon a los 75 dds, en esta etapa la parte aérea se separó de la raíz. Las raíces de cada uno de los sustratos, se lavaron con agua de la llave para determinar el volumen radical para ello se utilizó una probeta de 100 mL a la cual se le vació agua hasta 50 mL. Las raíces se colocaron dentro de la probeta para obtener, por desplazamiento de agua, el volumen radical por tratamiento.

2.4.4 Análisis micromorfológico de la interacción sustrato-raíz-HMA

2.4.4.1 Secciones delgadas

Se realizó el análisis en secciones delgadas con el fin de analizar la porosidad y la distribución y ordenamiento de partículas en los sustratos probados así como la interacción de estos con HMA y raíces de lechuga. Las macetas se dejaron secar al aire libre y se impregnaron con resina poliéster insaturada y monómero de

estireno en proporción 7:3. Posteriormente la mezcla solidificó a la sombra por 30 días aproximadamente. Las muestras una vez endurecidas se cortaron con un disco de punta de diamante. Después, se pulieron con abrasivos de carburo de silicio (carborodum) y óxido de aluminio (aloxita) hasta tener un espesor de 30 μm y se elaboraron las secciones delgadas de 5 x 7.5 cm.

2.4.4.2 Análisis de imágenes

Con el fin de homogeneizar las dimensiones de las secciones delgadas, todas se recortaron entre 5x 3 cm, centrándose en la parte radical. Esto consistió en escanear cada sección delgada y después, a través del programa Microsoft Power Point Versión 2010, se localizó el área a analizar y posteriormente, ésta se ubicó en cada sección delgada. Después se tomaron seis fotografías de las secciones delgadas con microscopio petrográfico de la marca Olympus® con objetivo de 2X (0.6 x 1 mm). Para procesar las imágenes se utilizó el programa Image-Pro Plus, versión 5.0 para así, cuantificar el espacio poroso. Adicionalmente, para determinar la relación entre las esporas de *Gi. gigantea* y las partículas de los componentes de los sustratos se obtuvieron imágenes utilizando luz plana con ayuda de los objetivos 2X, 4X, 10X y 20X.

2.4.5 Análisis de datos

El porcentaje de la colonización micorrízica se evaluó a través de estadísticos descriptivos de tendencia central, de dispersión, así como gráficas de barras. Después, se hizo un análisis de la varianza ($\alpha \leq 0.05$) y pruebas de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$) para determinar los sustratos que propiciaron mayor colonización por *Gi. gigantea*.

Para identificar la relación entre el desarrollo de las plántulas (peso seco de la parte aérea y raíz así como volumen radical) en los diferentes sustratos en ambos experimentos, dichas variables se analizaron con: estadísticos descriptivos, diagramas de crecimiento, ANOVA del Diseño Completamente al Azar ($\alpha \leq 0.05$) y análisis de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Posteriormente, para evaluar la respuesta y encontrar diferencias entre el peso seco de la parte aérea y raíz y volumen radical, entre ambos experimentos (NI y *Gi. gigantea*) se realizaron

pruebas de T para comparación de medias en muestras independientes ($\alpha \leq 0.05$) entre tratamientos similares (sustratos que se probaron en cada experimento).

La capacidad de retención de humedad para cada sustrato se determinó a partir de calcular el espacio poroso total (EPT). Los sustratos se saturaron por 24 h (tensión cero), siendo también sometidos a las tensiones 10, 50 y 100 Kpa; dieron lugar a las curvas de retención de humedad, en cada uno de estos (Figura 2.1).

En la evaluación de las demás propiedades físicas (D_a y D_r) y químicas (pH y CE) para cada uno de los sustratos, las determinaciones se hicieron por triplicado, utilizando estadísticos descriptivos de tendencia central. Para cada uno de los análisis, el programa estadístico que se utilizó fue el Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

2.5 Resultados

2.5.1 Colonización micorrízica y número de esporas en los sustratos probados

Los sustratos que propiciaron el mayor porcentaje de colonización micorrízica en las raíces de las plantas de lechuga fueron Tur:A:V a granel, Bg:P:T 1-2 mm y los sustratos con menor colonización correspondieron a la granulometría < 0.6 mm (Figura 2.2). El análisis de la varianza (Anexo 2.1) muestra que hubo diferencias altamente significativas entre los tratamientos. La Figura 2.3 muestra la colonización que se observaron en raíces de lechuga evaluadas a los 75 días después de la siembra en los sustratos Bg:P:T 1-2 mm y Tur:A:V a granel.

El mayor número de esporas por gramo de sustrato seco se obtuvo en la mezcla a granel de Tur:A:V, la cual fue significativamente diferente de Bg:P:T 1-2 mm. Los sustratos donde se obtuvo menor número de esporas fueron los de granulometría 0.6-1 y < 0.6 mm (Figura 2.4). El análisis de la varianza (Anexo 2.1) muestra que existieron diferencias altamente significativas en esta variable de respuesta y que hubo R^2 de 98.56%, lo que indica la influencia del sustrato en esta variable respuesta.

2.5.2 Peso seco de la parte aérea

En el peso seco de la parte aérea de las plantas no inoculadas, se observó que la granulometría de los sustratos donde ocurrieron los valores más altos de esta variable de respuesta fue < 0.6 mm y Bf:P (0.6-1 mm). Los sustratos Bg:P:T (1-2 mm) y Tur:A:V fueron estadísticamente similares y los que propiciaron menor peso seco de la parte aérea fueron Bf:T y Bf:P ambos con granulometría de 1-2 mm (Figura 2.5). El análisis de la varianza muestra que hubo diferencias altamente significativas entre tratamientos (Anexo 2.1).

En el experimento inoculado con *Gi. gigantea*, el tamaño de partícula de los sustratos donde se encontraron los valores más altos en esta variable de respuesta fueron < 0.6 mm y Bg:T (0.6-1 mm), en tanto que los sustratos que propiciaron el menor peso seco de la parte aérea fueron Bf:T y Bf:P con granulometría de 1-2 mm (Figura 2.6).

En el análisis de la varianza se observaron diferencias estadísticas altamente significativas en al menos uno de los tratamientos (Anexo 2.1). En la prueba T (Anexo 4), los sustratos donde se encontraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$), entre los los experimentos fueron: Bf:T 0.6 -1 mm, Bf:P 0.6-1, Bf:P 1-2 mm y Bg:P:T 1-2 mm. En esta variable de respuesta los demás tratamientos resultaron estadísticamente similares.

A continuación se presentan los resultados de las variables de la planta que pudieron influir en la colonización micorrízica y la producción de esporas: volumen radical y peso seco de la raíz ya que el peso seco y volumen radical de las plantas de lechuga pudieron influir en la colonización micorrízica y la producción de esporas, esto debido a que la raíz es la zona de interacción entre la planta y el hongo micorrízico.

2.5.3 Peso seco de la raíz

Se observa en esta variable de respuesta, del experimento no inoculado, que la granulometría de los sustratos donde hubo mayor peso seco de la raíz, fue < 0.6 mm y 0.6-1 mm (Figura 2.7). El análisis de la varianza (Anexo 2.1) se distingue diferencias altamente significativas entre tratamientos.

En el experimento inoculado con *Gi. gigantea*, la granulometría de los sustratos donde hubo mayor peso seco de la raíz fue < 0.6 mm y 0.6-1 mm. El análisis de la

varianza (Anexo 2.1) muestra que hubo diferencia altamente significativas entre los tratamientos.

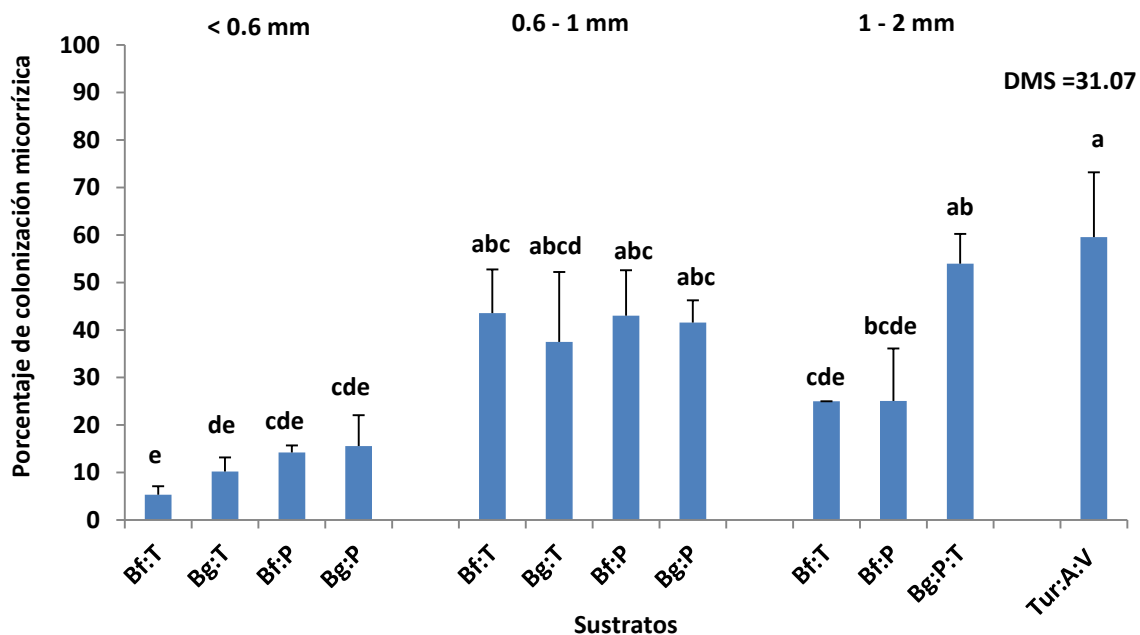


Figura 2.2 Porcentaje de colonización micorrízica en plántulas de lechuga inoculadas con *Gigaspora gigantea* en los sustratos (75 días después de la siembra). DMS= Diferencia mínima significativa.

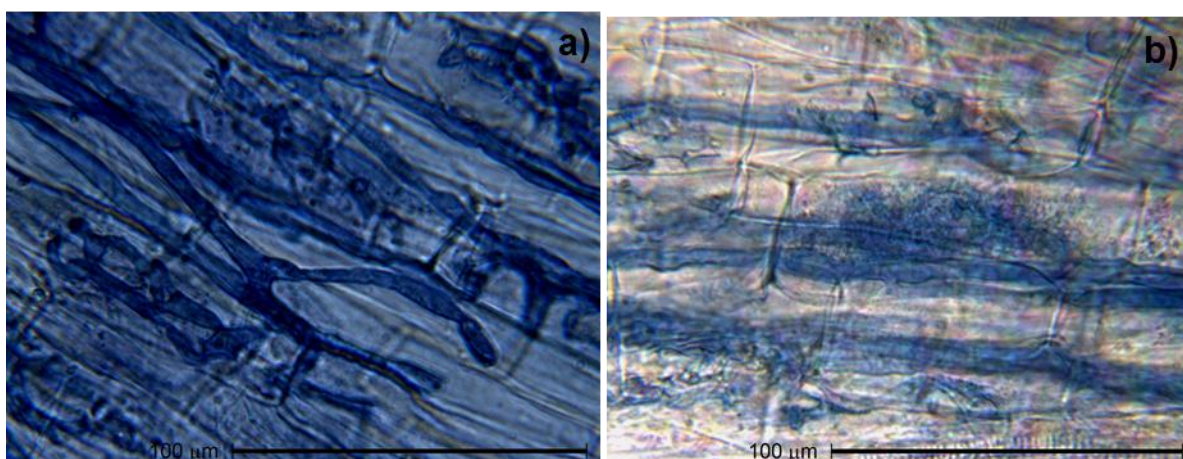


Figura 2.3 Arbúsculos y micelio intrarradical en raíces de lechuga colonizadas por *Gigaspora gigantea* 75 días después de la siembra en los sustratos a) Bg:P:T 1-2 mm y b) Tur:A:V a granel.

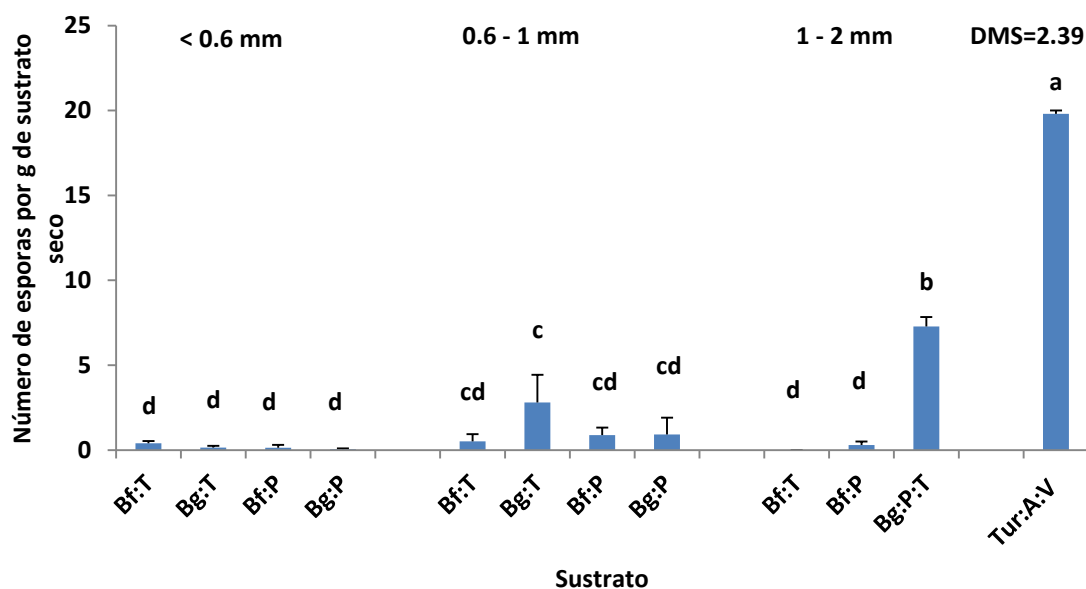


Figura 2.4 Número de esporas de *Gigaspora gigantea* en los sustratos probados (a los 75 días después de la siembra). DMS= Diferencia mínima significativa.

En la prueba T (Anexo 2.3) los sustratos donde se encontraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre los tratamientos de inoculación de ambos experimentos fueron: Bf:T 0.6 -1 mm y Bf:T 1-2 mm, los demás tratamientos resultaron estadísticamente similares.

En el experimento no inoculado en esta variable de respuesta, el análisis de la varianza muestra que hubo diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Anexo 2.1). El tamaño de partícula donde hubo mayor volumen radical fue < 0.6 mm y 0.6-1 mm (Figura 2.9).

En tanto que el análisis de la varianza (Anexo 2.1) del experimento inoculado con *Gi. gigantea*, existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, los sustratos con granulometría < 0.6 mm y 0.6-1 mm nuevamente presentaron los valores más altos en esta variable de respuesta (Figura 2.10).

En la prueba T (Anexo 2.2) los sustratos donde se encontraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre los experimentos fueron: Bf:T < 0.6 mm y Bf:P 1-2 mm; en esta variable de respuesta, los demás tratamientos resultaron estadísticamente similares.

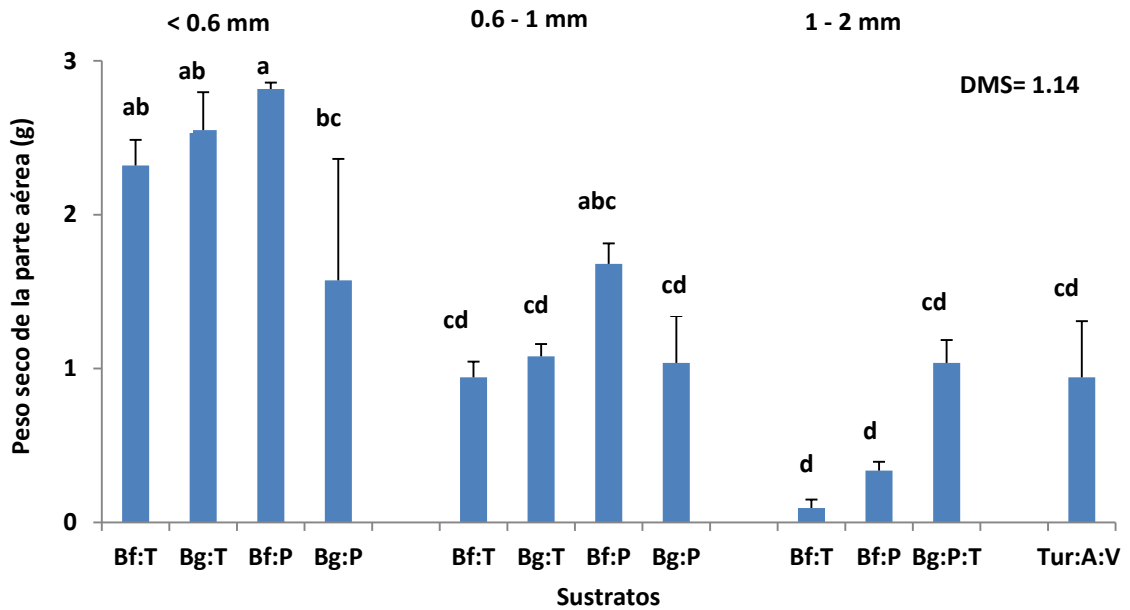


Figura 2.5. Peso seco de la parte aérea de plántulas de lechuga del tratamiento no inoculado en los sustratos probados. DMS= Diferencia mínima significativa.

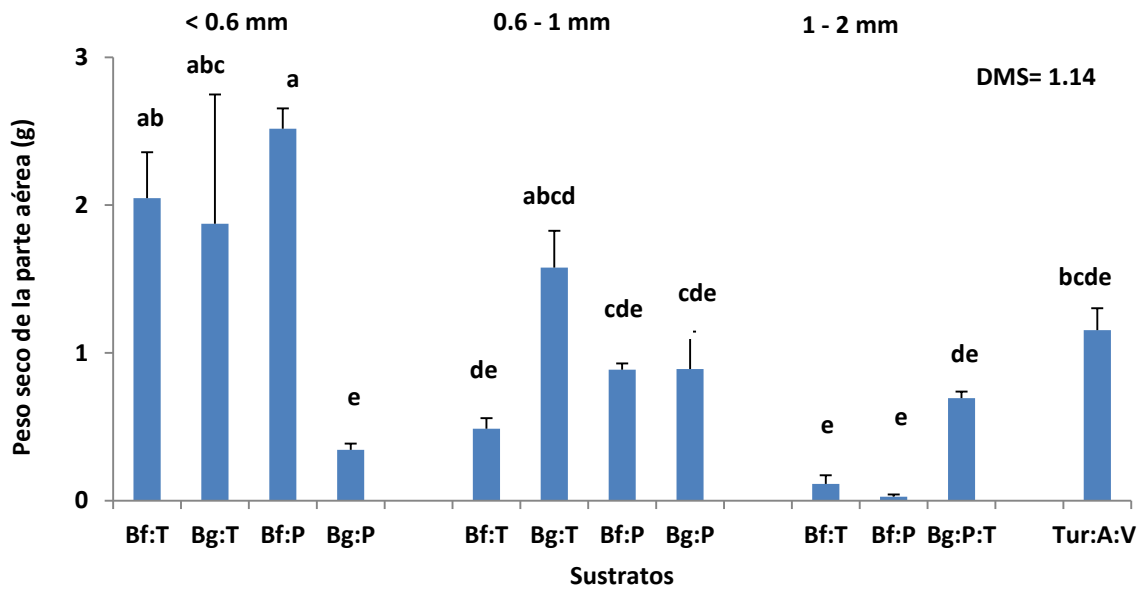


Figura 2.6. Peso seco de la parte aérea de plántulas de lechuga del tratamiento de inoculación con *Gigaspora gigantea* en los sustratos probados. DMS= Diferencia mínima significativa.

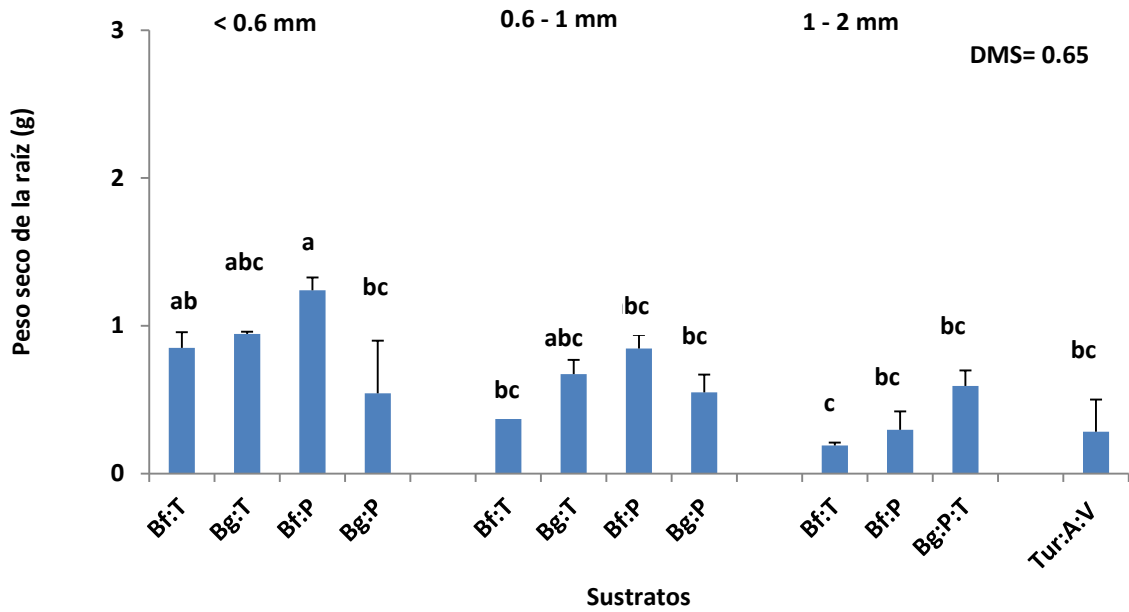


Figura 2.7. Peso seco de la raíz de plántulas de lechuga del tratamiento no inoculado en los sustratos probados. DMS= Diferencia mínima significativa.

2.5.4 Volumen radical

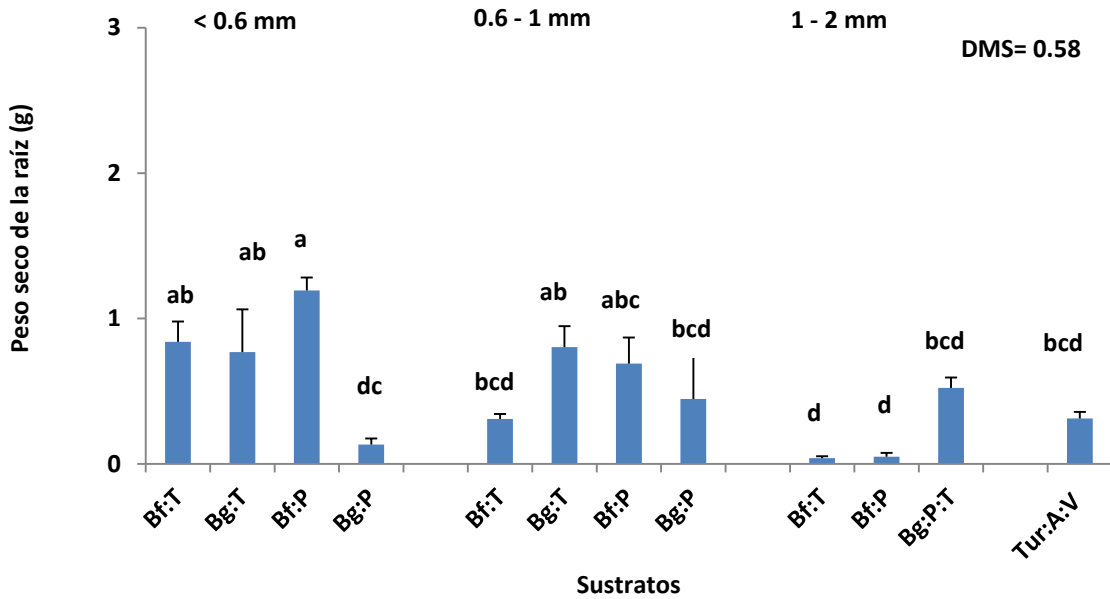


Figura 2.8. Peso seco de la raíz de plántulas de lechuga del tratamiento inoculado con *Gigaspora gigantea* en los sustratos probados. DMS= Diferencia mínima significativa.

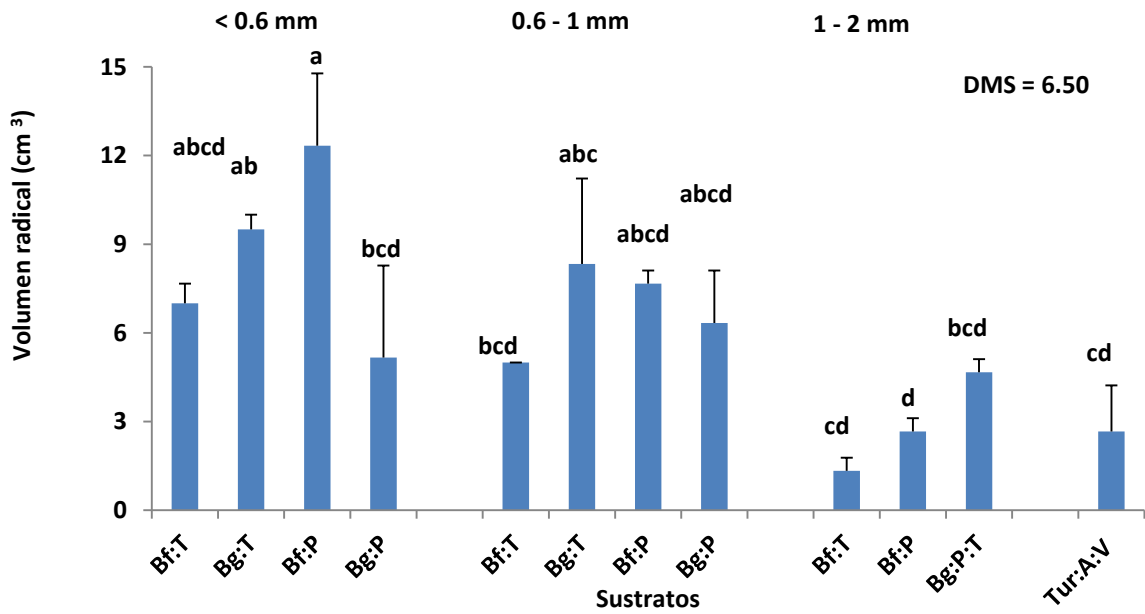


Figura 2.9. Volumen radical de plántulas de lechuga del tratamiento no inoculado en los sustratos probados. DMS= Diferencia mínima significativa.

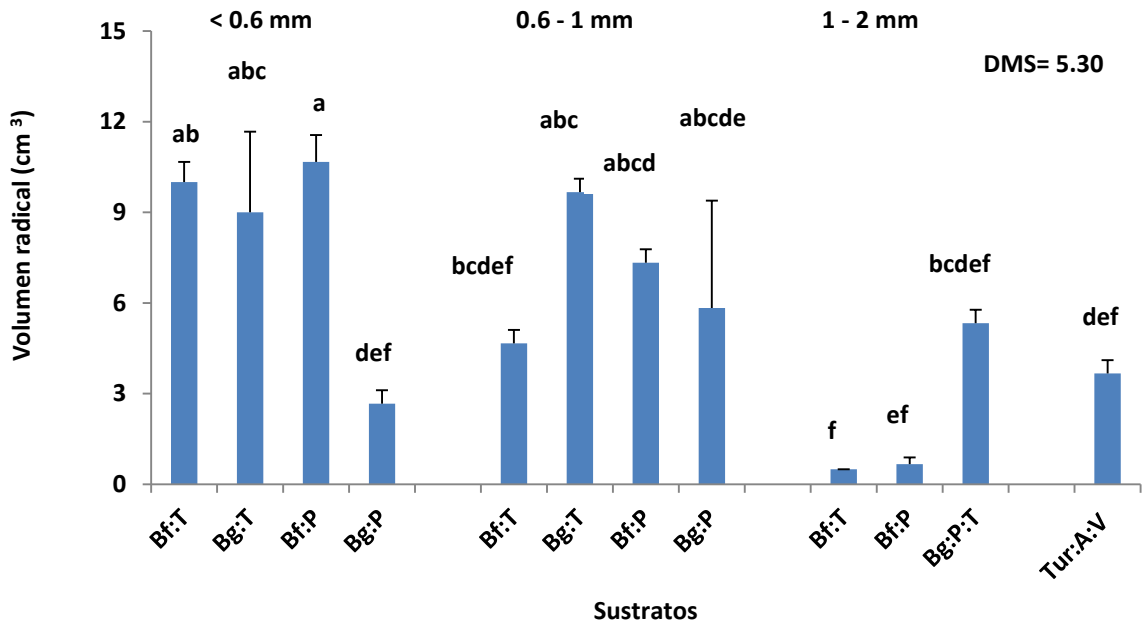


Figura 2.10. Volumen radical de plántulas de lechuga del tratamiento inoculado con *Gigaspora gigantea*, en los sustratos probados. DMS= Diferencia mínima significativa.

2.5.5 Propiedades físicas y químicas de los sustratos probados

2.5.5.1 Análisis de los sustratos experimentales

El pH de los sustratos es ligeramente ácido (entre 6.2 y 6.9) y moderadamente ácido (5.3) en el sustrato Tur.A.V a granel. Donde se presentó menor conductividad eléctrica fue Bg:P:T 1-2 mm (Anexo 2.5).

Los sustratos que presentaron la mayor densidad aparente fueron los de granulometría < 0.6 mm, con excepción de Bg:P. y los que presentaron densidades reales mayores fueron Bf:T, Bg:T, Bg:P (< 0.6 mm), en tanto que Tur:A:V a granel tuvo el valor más bajo (1.2 g cm^{-3}). El sustrato que presentó mayor espacio poroso total fue Bf:P 1-2 mm y el que estadísticamente obtuvo menor espacio poroso total fue Bf:P < 0.6 mm con 73.77% (Anexo 2.5).

2.5.5.2 Curvas de retención de humedad

Las partículas de los sustratos con granulometría de < 0.6 mm a las 24 h (Figura 2.11) tuvieron menor capacidad de retener humedad a tensión cero que las de tamaño de partícula mayor 1-2 mm (Figura 2.12). Sin embargo, en los sustratos con granulometría menor la humedad se retuvo con mayor fuerza a medida que fueron sometidos a las tensiones más altas (50 y 100 kpa) y por tanto no liberaron el agua fácilmente en comparación con los sustratos de granulometría más alta. Por el contrario, a medida que el tamaño de partícula de los sustratos probados se incrementó, aumentó su capacidad de retenerla a tensión cero, pero de perderla con facilidad al aumentar las tensiones (Figuras 2.11 - 2.13).

2.5.6 Análisis micromorfológico de los sustratos no inoculados e inoculados con *Gigaspora gigantea* a los 75 días después de la siembra

En los Cuadros 2.2 y 2.3 se presentan los resultados del porcentaje de porosidad de cada sustrato en las secciones delgadas, donde se analizaron, en cada una de éstas, seis campos de observación en zonas superior, intermedia y baja de la sección delgada siguiendo la metodología de Gutiérrez-Castorena *et al.* (2011).

Cuadro 2.1 Características físicas y químicas de los sustratos probados

Tamaño Partícula	Sustrato	pH	CE $\mu\text{mhos} \cdot \text{cm}^{-2}$	Da $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	Dr $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	EPT %
< 0.6 mm	Bf:T	6.9 (0.33)	148.3 (4.10)	0.6 (0.01)	2.5 (0.01)	80.9 (0.7)
	Bg:T	6.7 (0.16)	155.7 (12.3)	0.5 (0.01)	2.5 (0.06)	82.6 (0.4)
	Bf:P	6.5 (0.14)	141.4 (27.2)	0.5 (0.01)	1.0 (0.10)	73.7 (1.3)
	Bg:P	6.2 (0.15)	165.8 (16.8)	0.4 (0.00)	2.5 (0.01)	78.3 (1.0)
0.6-1 mm	Bf:T	6.5 (0.27)	150.7 (5.50)	0.4 (0.01)	2.3 (0.01)	84.1 (0.6)
	Bg:T	6.4 (0.11)	150.2 (30.4)	0.4 (0.01)	2.7 (0.10)	82.0 (0.7)
	Bf:P	6.3 (0.19)	147.7 (27.0)	0.4 (0.01)	2.2 (0.01)	82.7 (0.1)
	Bg:P	6.3 (0.15)	124.6 (17.0)	0.5 (0.01)	2.2 (0.06)	81.6 (0.46)
1-2 mm	Bf:T	6.2 (0.35)	158.7 (20.0)	0.2 (0.01)	2.4 (0.09)	86.1 (0.6)
	Bf:P	6.2 (0.12)	137.0 (23.0)	0.2 (0.01)	2.1 (0.11)	91.1 (0.5)
	Bg:P:T	6.2 (0.01)	56.9 (7.1)	0.4 (0.39)	2.4 (0.03)	83.8 (0.2)
A granel	Tur:A:V	5.3 (0.04)	108.2 (6.3)	0.2 (0.01)	1.2 (0.12)	78.9 (1.91)
	DMS	0.784	73.455	0.042	0.353	3.414

CE= Conductividad eléctrica,. Da.= densidad aparente, Dr.= densidad real, EPT= espacio poroso total. DMS =Diferencia mínima significativa. El valor entre paréntesis representa la desviación estándar para cada una de estas propiedades en cada sustrato, n=3.

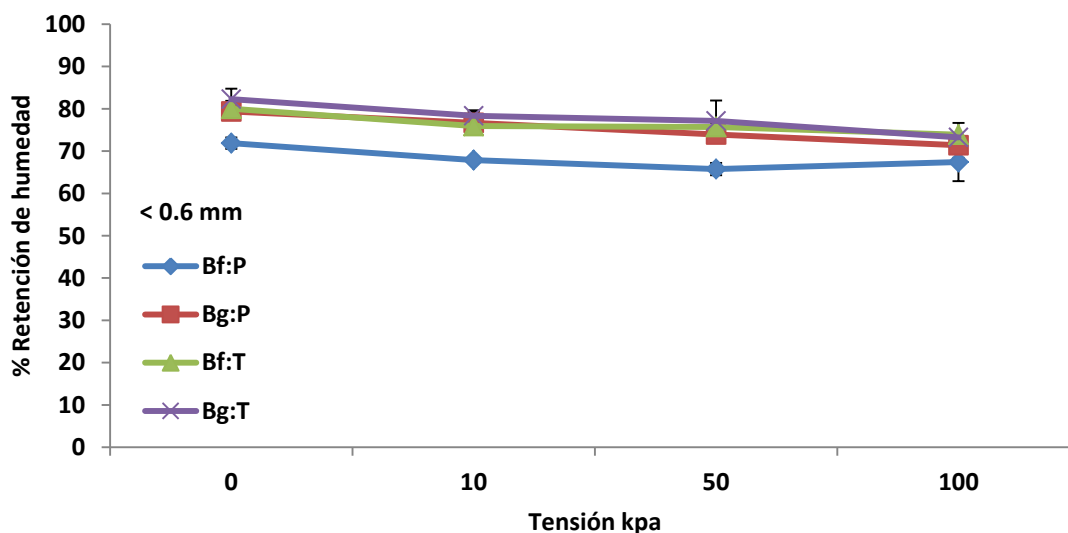


Figura 2.11: Capacidad de retención de humedad en sustratos de granulometría < 0.6 mm a diferentes tensiones después de 24 h.

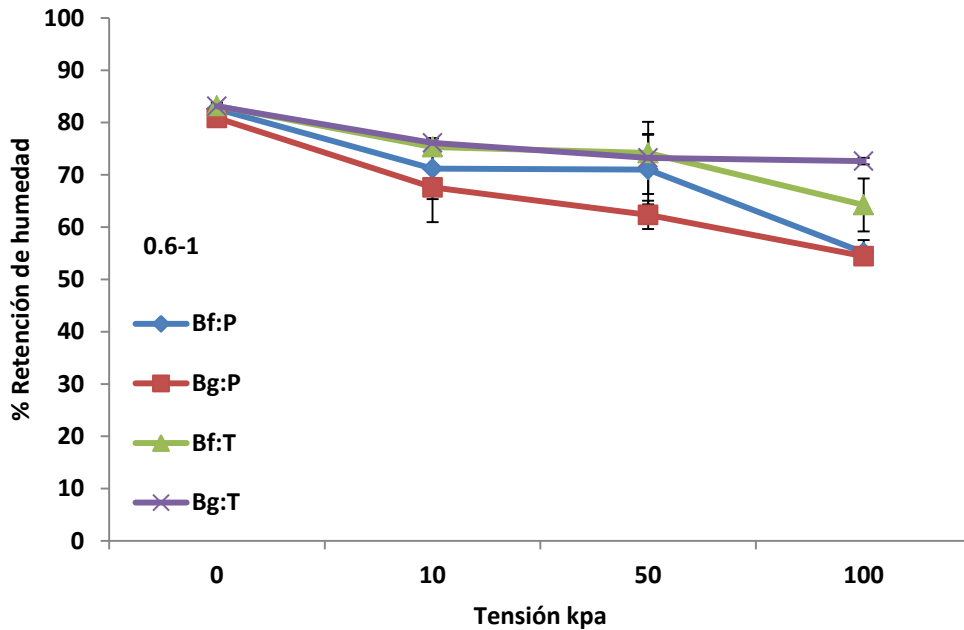


Figura 2.12. Capacidad de retención de humedad en sustratos de granulometría de 0.6- 1 mm a diferentes tensiones después de 24 h.

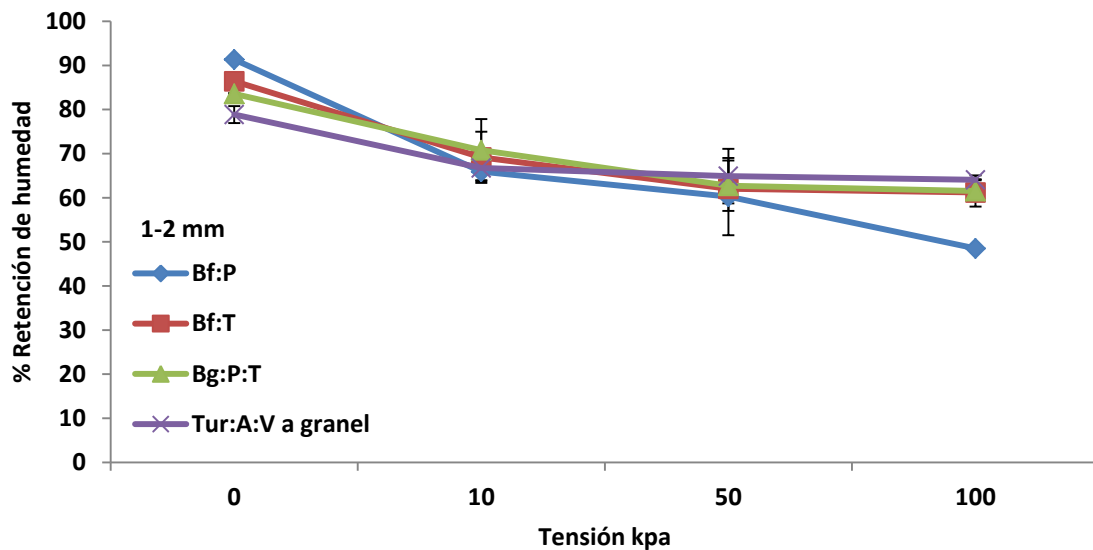


Figura 2.13. Capacidad de retención de humedad en sustratos de granulometría mayor 1-2 mm a diferentes tensiones después de 24 h.

El cálculo se realizó con el programa Image-Pro-Plus versión 5 con objetivo 2X. En el presente trabajo se denotan tres valores en las secciones delgadas analizadas,

los cuales representan dentro de círculos el porcentaje de porosidad (alto-medio-bajo).

En ambos experimentos de inoculación, el acomodo, distribución de partículas, así como el espacio poroso presentaron variaciones, debidas principalmente al tamaño de partícula empleado en los sustratos, lo que propició diferencias en la capacidad de aireación y retención de humedad en cada sustrato (Figura 2.14).

En el experimento inoculado con *Gi. gigantea*, los sustratos con base en Bf con granulometría de 1-2 mm presentaron el mayor espacio poroso: Bf:T (44-70%) y Bf:P (49-64%) y menor capacidad de retención de humedad, lo que sugiere que el empaquetamiento complejo y la forma de las partículas propiciaron mayor drenaje. En tanto que en Bg:P:T, por la forma granular de sus partículas orgánicas, se propició que se retuviera la humedad con mayor fuerza que en las mezclas anteriores y adicionalmente, sus partículas inorgánicas coadyuvaran en mantener la aireación para el desarrollo de las raíces colonizadas y la formación de esporas (Figura 2.15).

Cuadro 2.2 Porosidad total en mezclas de sustratos no inoculados en seis puntos de secciones delgadas.

Tamaño Partícula	Sustrato	% Espacio poroso						σ
		1	2	3	4	5	6	
< 0.6 mm	Bf:T	32.4581	24.6658	18.8355	14.2586	32.075	26.717	5.5817
	Bg:T	17.3636	31.8552	28.3306	17.2308	21.112	21.379	4.8095
	Bf:P	27.5173	27.6927	29.7215	22.0447	28.8461	30.0188	1.9061
	Bg:P	27.7463	18.521	28.2158	14.1563	24.577	18.3064	4.9259
0.6-1 mm	Bf:T	40.134	47.3732	35.3608	38.5467	33.4416	31.6405	4.2685
	Bg:T	29.2983	22.9099	28.5159	37.8291	28.4562	28.2219	2.9056
	Bf:P	36.6678	38.871	33.3228	40.1073	50.7594	26.524	5.5371
	Bg:P	35.3227	33.4887	44.6119	26.2979	30.5775	32.7485	4.084
1-2 mm	Bf:T	54.4901	46.1109	56.2557	50.9299	54.4322	44.4693	3.9446
	Bf:P	69.7033	59.4645	50.556	62.1058	55.5399	47.1555	6.337
A granel	Tur:A:V	34.7009	38.9382	52.0151	40.8007	55.3414	49.5736	7.0817

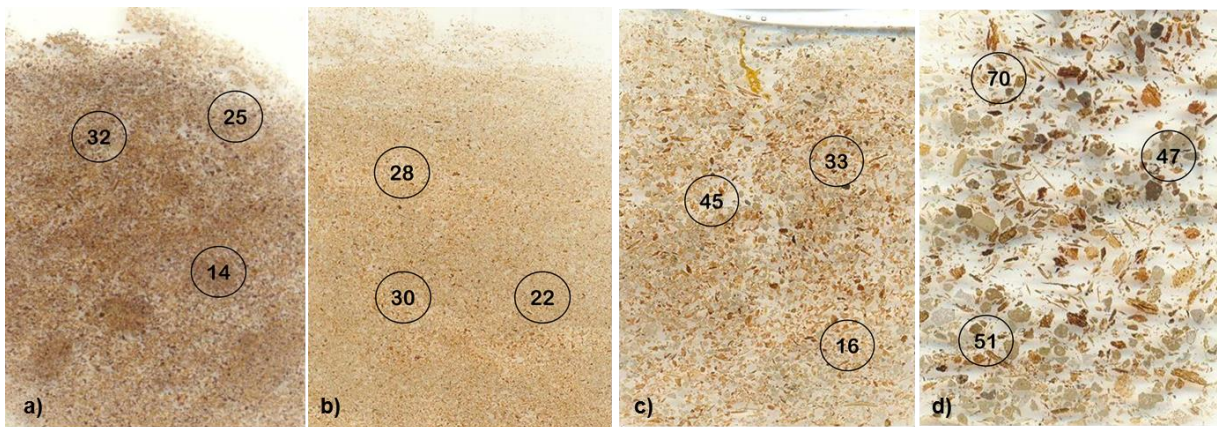


Figura 2.14. Distribución de partículas de los sustratos no inoculados a) Bf:T < 0.6 mm, b) Bf:P <0.6 mm, c) Bf:P 0.6-1 mm, d) Bf:P 1-2. Los círculos representan el porcentaje de espacio poroso de éstas. Dimensiones de las secciones delgadas 3x5 cm.

En los sustratos con granulometría de < 0.6 mm inoculados, fue notable la participación de la raíz, ya que ésta propició el incremento del espacio poroso (Figura 2.16). Los sustratos en este tamaño de partícula presentaron mayor capacidad de retención de humedad independientemente del tipo de bonote de coco empleado (Figura 2.11). Esto fue debido a que las partículas del bonote de coco, al presentar mayor superficie específica incrementaron la adhesión entre las moléculas de agua en la superficie, lo que ocasionó reducción en el espacio poroso, bajo porcentaje en colonización micorrízica y la ausencia de esporas.

En la Figuras 2.19 c,d se muestra que la presencia de las esporas en el sustrato Bg:P:T 1-2 mm, se relacionó con la presencia de poros de empaquetamiento complejo donde tuvo lugar la percolación entre las partículas del sustrato; y por otro, a la presencia de partículas inorgánicas (PI), donde se presume fue menor el almacenamiento de agua entre las partículas.

En el estudio micromorfológico del sustrato Bg:P:T también se muestra que el número de esporas pudo estar subestimado debido a que algunas de éstas se encontraron relacionadas también con poros vesícula fracturados de las partículas de tezontle, razón por lo cual, no se pudieron aislar por estar retenidas en el tamiz de mayor abertura de malla al emplear la técnica del tamizado húmedo, propuesta

por Gerdemann y Nicolson (1963) y no ser consideradas en el conteo (Figura 2.20 a, b).

Cuadro 2.3. Porosidad total en mezclas de sustratos inoculados con *Gigaspora gigantea* en seis puntos en secciones delgadas.

Tamaño Partícula	Sustrato	% Espacio poroso						σ
		1	2	3	4	5	6	
< 0.6 mm	Bf:T	38.516	43.432	23.004	36.1375	30.1586	41.6746	5.9372
	Bg:T	29.4546	25.1975	36.3317	27.7574	35.3766	28.1116	3.655
	Bf:P	55.9705	51.413	25.4417	39.999	42.75	28.0462	9.4411
	Bg:P	38.577	22.3541	26.9989	29.597	26.1349	22.7116	3.6331
0.6-1 mm	Bf:T	40.3373	38.4655	40.4187	50.6019	40.9945	42.5993	2.4939
	Bg:T	49.3953	43.9698	34.8968	44.512	43.8111	42.9446	2.8894
	Bf:P	29.7526	33.1062	40.8899	48.9731	46.0884	31.8889	6.8672
	Bg:P	41.6745	31.2922	47.3317	24.0167	25.7937	43.4861	8.5649
1-2 mm	Bf:T	63.9373	69.739	53.3179	55.4845	51.3259	44.0724	6.0144
	Bf:P	49.4549	60.6086	53.8596	57.2928	51.2143	64.2662	4.6064
	Bg:P:T	38.7223	30.6215	46.8767	33.9877	45.2886	34.4372	5.3068
A. granel	Tur:A:V	51.5021	49.9106	41.9655	55.5484	46.3757	53.9595	3.8042

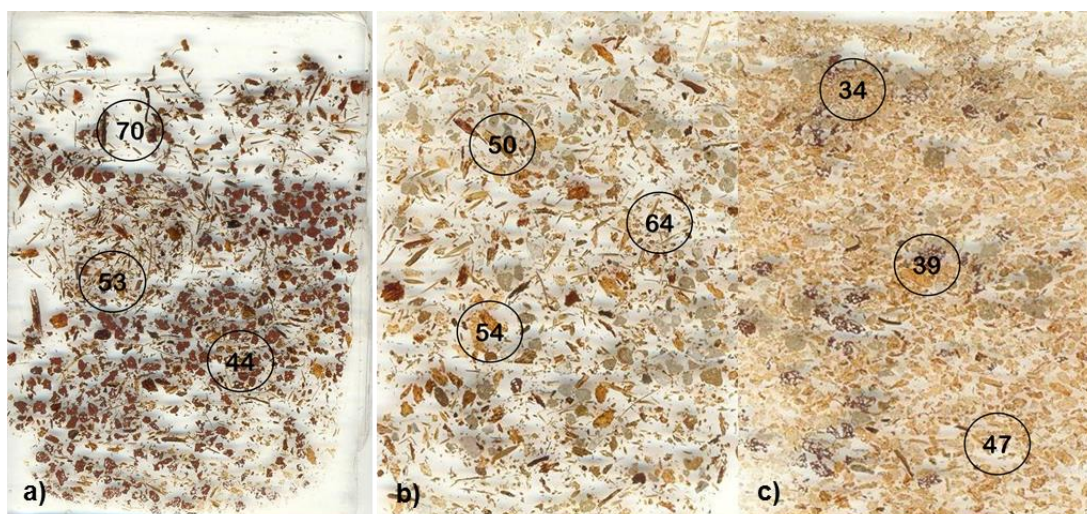


Figura 2.15. Distribución en secciones delgadas de partículas de los sustratos inoculados con *Gigaspora gigantea* a) Bf:T, b) Bf:P y c) Bg:P:T con granulometría de 1-2 mm. Los círculos representan el porcentaje del espacio poroso en secciones delgadas de los sustratos. Dimensiones de las secciones delgadas 3x5 cm.

La formación de las esporas en el sustrato Tur:A:V a granel, se relaciona por un lado con las partículas menores a 1 mm, donde se tuvo mayor capacidad de humedad y por otro a la presencia de partículas con granulometrías mayores que propiciarán mayor espacio poroso. En el estudio micromorfológico se muestra que la cantidad de esporas de *Gi. gigantea* se relacionó mayormente con poros de empaquetamiento complejo (Figuras 2.19 a, b).

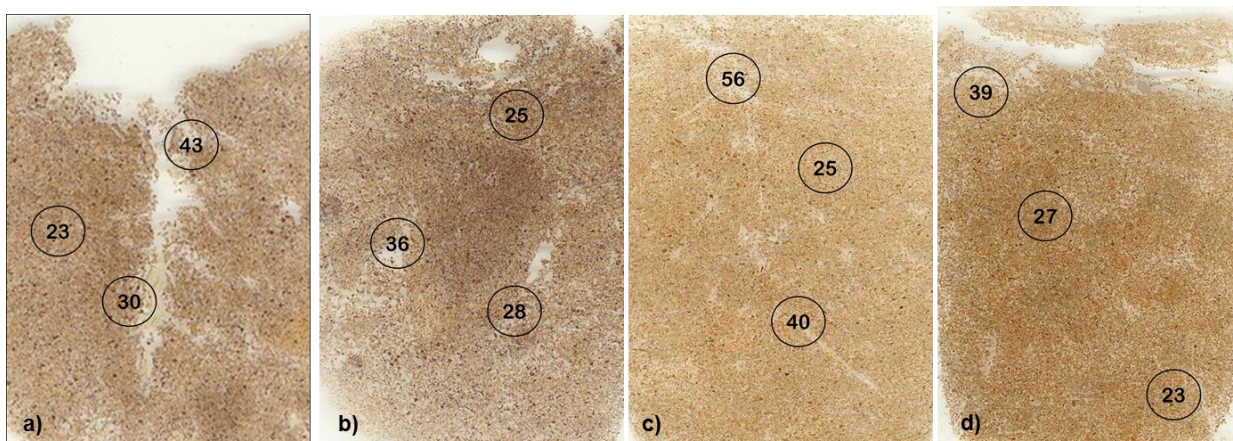


Figura 2.16. Distribución de partículas de los sustratos inoculados con *Gigaspora gigantea* a) Bf:T, b) Bg:T, c) Bf:P, d) Bg:P con granulometría de < 0.6 mm. Los círculos representan el porcentaje del espacio poroso Dimensiones de las secciones delgadas 3x5 cm.

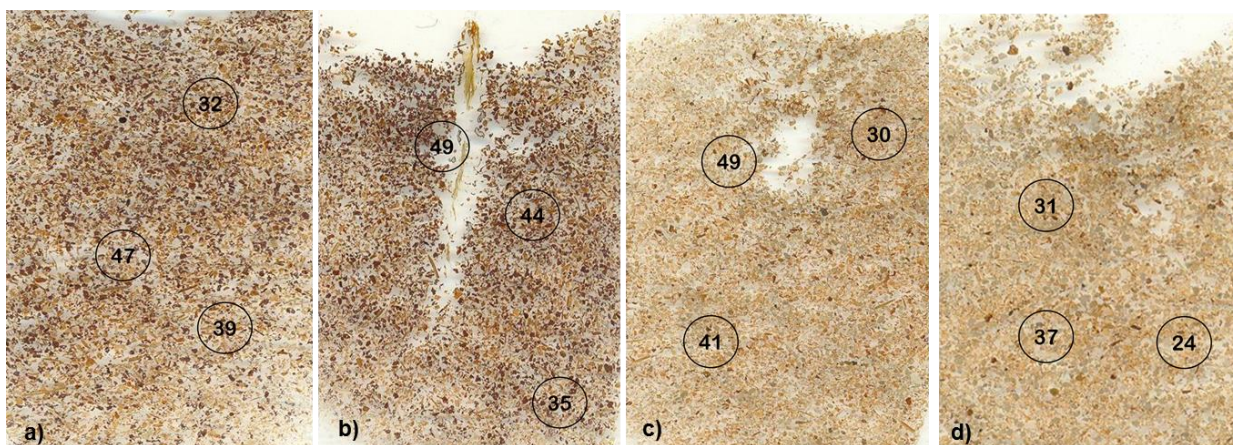


Figura 2.17. Distribución de partículas de los sustratos inoculados con *Gigaspora gigantea* a) Bf:T, b) Bg:T, c) Bf:P, d) Bg:P con granulometría de 0.6-1 mm. Los círculos representan el porcentaje del espacio poroso de los sustratos. Dimensiones de las secciones delgadas 3x5 cm.

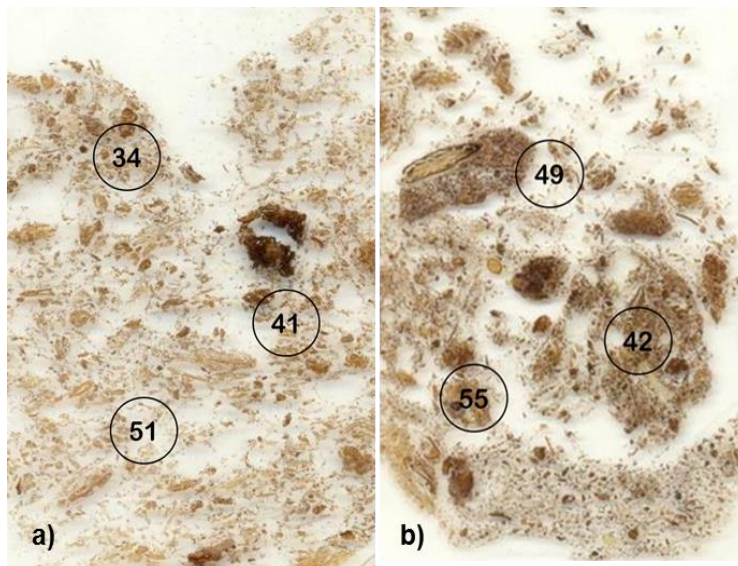


Figura 2.18. Distribución en secciones delgadas de partículas del sustrato Tur:A:V a granel a) no inoculado b) inoculado con *Gigaspora gigantea*. Dimensiones de las secciones delgadas 3x5 cm.

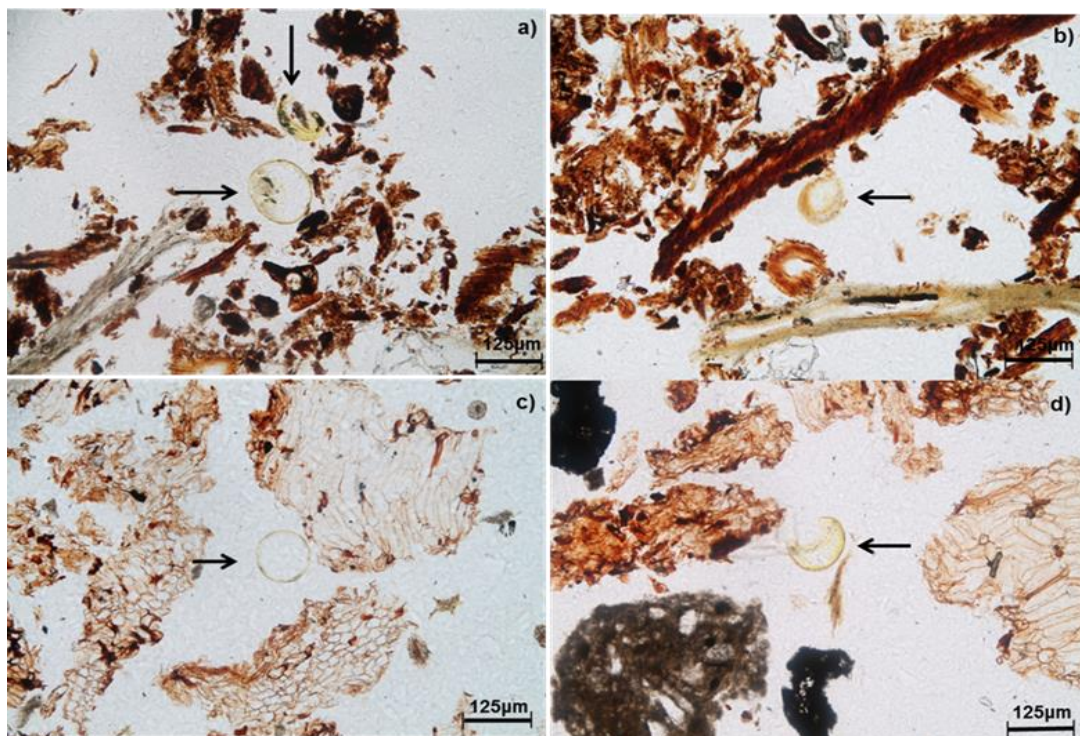


Figura 2.19. Secciones delgadas que muestran a) esporas de *Gigaspora gigantea* entre los poros de empaquetamiento complejo de los sustratos a Tur:A:V a granel, b) espora de *Gigaspora gigantea* relacionada con raíz c) espora asociada a partículas orgánicas de Bg:P:T 1-2, d) espora asociada a poros de empaquetamiento complejo en Bg:P:T 1-2 mm.

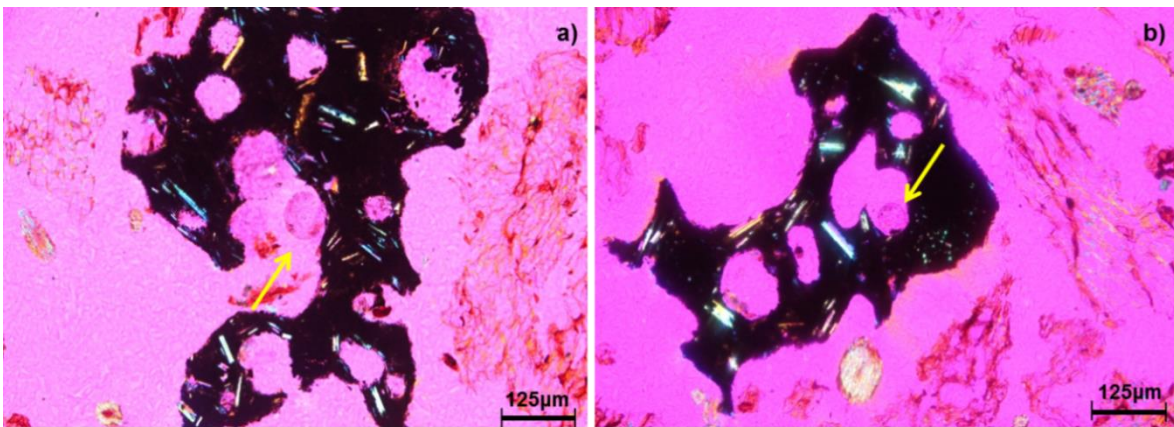


Figura 2.20. Secciones delgadas que muestran esporas de *Gigaspora gigantea* relacionadas con poros vesícula fracturados de partículas de tezontle en Bg:P:T 1-2 mm observadas con luz cruzada con microscopio petrográfico.

2.6 Discusión

Según Saif (1981), el sustrato ideal para la propagación de HMA debe permitir el establecimiento funcional de la simbiosis micorrízica y ayudar a la provisión de agua y aire en el crecimiento de los simbiontes involucrados.

Guzmán-Plazola *et al.* (1990) probaron bonote solo y en mezcla con suelo, así como arena-suelo (testigo) para propiciar la colonización en *Phaseolus vulgaris* y producción de esporas de *Glomus* sp. Ellos reportaron que el bonote sólo o en mezcla fue inapropiado para la colonización micorrízica (17.5%) y producción (52 esporas·100 mL⁻¹ de sustrato), en comparación con el tratamiento testigo, el cual tuvo 83.5% de colonización y 882 esporas·100 mL⁻¹ sustrato.

Douds *et al.* (1998) utilizaron como sustrato una mezcla de arena: vermiculita: arcilla (75:1:1 v/v), para propagar con dos variedades de *Medicago sativa* L. (Gilboa y Moapa) y *Paspalum notatum* a *Gigaspora margarita*. Después de 21 semanas se evaluó el número de esporas producidas. Con *M. sativa* var. Gilboa se produjeron 175 esporas, con la variedad Moapa 52 esporas y para *P. notatum* 1659 esporas de *Gi. margarita* en 43 cm³ de sustrato. Por su parte Santos *et al.* (2000) utilizaron una mezcla de suelo y arena (1:1 v/v) para propagar hongos de *Gi. margarita* y *Rhizophagus clarus* (antes *Glomus clarum*) con *Brachiaria decumbens* como planta hospedera. Después de cinco meses estos autores obtuvieron 490 y 4300 esporas en 100 g de sustrato respectivamente. Los datos

anteriores ponen de manifiesto que la velocidad de esporulación de *Gigaspora* en relación a otros géneros es más lenta y que esto también está influenciado tanto por el tipo de sustrato como por la especie o variedad de planta hospedera utilizada.

El tamaño, la forma y composición de los componentes de la partículas son características decisivas que determinan de manera significativa las propiedades físicas, químicas y micromorfológicas tanto en el desarrollo de la planta (Anicua *et al.* 2009) como en el establecimiento de la simbiosis micorrízica y número de esporas (Gaur y andoheya, 2000). Cuando se combinan las partículas orgánicas e inorgánicas de un mismo diámetro, se forman poros de empaquetamiento complejo (Bullock *et al.*, 1985) y las propiedades físicas se relacionan con la proporción de cada tipo de partícula (más almacenamiento de agua a mayor contenido de bonote de coco y mayor percolación a mayor contenido de tezontle o piedra pómez).

El presente estudio mostró que en las mezclas que dieron origen a los sustratos con ambos tipos de bonote de coco (granular y fibroso) tienen características similares en retención de humedad, densidad aparente y real, así como espacio poroso y mayor efecto en las variables de respuesta de las plántulas de lechuga a medida que el tamaño de partícula disminuye. Asimismo, esto propició que se desarrollara la raíz, se formaran poros canal para que ésta pudiera respirar, pero no lo suficiente para que favoreciera la colonización micorrízica y la formación de esporas. La raíz en los sustratos de granulometría menor abrió espacio, y desplazó el sustrato circundante a las orillas de la maceta y por tanto, propició la disminución del espacio poroso.

Noguera *et al.* (2003) y Anicua-Sánchez *et al.* (2009) reportaron que en las partículas de los sustratos, la capacidad de retención de humedad se relaciona con el tipo de poros presentes entre las mezclas y con su superficie específicas; las cuales aumentan la fuerza de adhesión conforme disminuye el tamaño de las partículas.

Los sustratos con granulometría de 0.6-1 mm, excepto de Bf:T y Bg:P, tuvieron resultados similares en las variables de respuesta de las plánulas de lechuga a los con granulometría de < 0.6. En el análisis micromorfológico se muestra que el

sustrato desempeñó un papel decisivo en el desarrollo de la raíz, lo cual influyó con excepción de Bg:T, en la poca producción de esporas. Sin embargo, favoreció al establecimiento de la simbiosis micorrízica con ambos tipos de bonote.

Con respecto a los sustratos con granulometría de 1-2 mm, existieron diferencias tanto en las variables de respuesta de la planta, colonización y número de esporas entre Bf:P y Bf:T con respecto a Bg:P:T; debidas principalmente a la naturaleza de los tipos de bonote. Gutiérrez-Castorena *et al.* (2011) reportaron que para el bonote granular con granulometría 1-2 mm, la humedad disminuye cuando se mezcla con componentes inorgánicos como P y T, contribuyendo también al incremento en espacio poroso. Los autores también reportaron que cuando hubo mayor proporción del componente orgánico, se formaron poros de empaquetamiento compuesto, los cuales tienen capacidad para retener agua y nutrientes (Bullock *et al.*, 1985).

En la presente investigación, el tipo de poros presentes en los sustratos con Bf fue de percolación, lo cual propició disminución en retención de humedad en comparación con Bg:P:T; y por tanto aumento en espacio poroso, menor desarrollo de las variables de respuesta de la planta hospedera, así como en porcentaje de colonización y formación de esporas.

Gerdemann y Nicolson (1963) diseñaron la técnica para aislamiento de esporas a través del tamizado húmedo y decantación, utilizando una serie de tamices de diferente abertura de malla, la cual sigue usándose hasta nuestros días. Esta técnica ha sufrido pocas modificaciones, que están mayormente relacionadas en el manejo de las muestras de suelo o sustratos como por ejemplo la adición de agua oxigenada para ayudar a romper los agregados con mayor eficiencia y así liberar a las esporas que pudieran estar entre estos. En el análisis micromorfológico del sustrato Bg:P:T 1-2 mm (Figura 2.19), se muestra que las esporas *Gi. gigantea* se relacionan no sólo con el espacio poroso entre las partículas presentes, sino que lo están con los poros externos de las partículas de tezontle, donde pueden estar ocluidas.

Con respecto al sustrato a granel de Tur:A:V, aunque propició valores bajos en las variables de respuesta de la planta hospedera, pero los valores estadísticamente obtuvo los valores más altos en colonización micorrízica y formación de esporas.

En cuanto al pH, Skipper y Smith (1979) reportaron que para el caso de *Gigaspora* sp. el intervalo óptimo en suelo es 5.1 a 6.2, propiedad química que influyó de manera positiva en este sustrato (5.2) y negativamente para los demás.

En el análisis de las secciones delgadas para Tur:A:V a granel, se observó que la organización de sus componentes tuvieron un comportamiento de agrupación entre las partículas finas, lo que pudo influir tanto en su capacidad para retener humedad como en los poros de empaquetamiento complejo, lo que propició el flujo de aire entre partículas de mayor tamaño en beneficio de la colonización micorrízica y formación de esporas.

2.7 Conclusiones

La producción de inoculante micorrízico de *Gi. gigantea*, se relacionó con la forma y tamaños de partícula en las mezclas de sustratos, así como con la capacidad de retención de humedad para cada uno de estos, lo que originó diferencias en la formación de esporas y desarrollo de la raíz hospedera.

Los sustratos con granulometría < 0.6 mm tuvieron mayor capacidad de retención de humedad y menor aireación lo que propició mayor volumen radical, peso seco de la parte aérea y radical en las plántulas de lechuga, independientemente del tipo de bonote de coco que se empleó y tratamiento de inoculación. Sin embargo, debido a este comportamiento con su planta hospedera, se infiere que hubo mayor superficie específica entre las partículas de los sustratos y con esto, menor aireación. A medida que la raíz se desarrollaba, se formaron canales pero alrededor de estos y en el resto de la maceta se generó compactación de partículas, condición que no permitió la colonización y esporulación de *G. gigantea*.

Los sustratos con granulometría de 0.6-1 mm favorecieron el mayor porcentaje de colonización micorrízica en las raíces de lechuga; lo cual sería una excelente respuesta para otras especies micorrízicas, donde las raíces colonizadas son propágulos infectivos, pero no para el género *Gigaspora*, mismas que no fueron favorecidas por el sustrato.

Los sustratos con bonote fibroso (Bf:T y Bf:P) y granulometría de 1-2 mm tuvieron poros de percolación mayores y consecuente menor retención de humedad en

comparación con los otros tamaños de partícula; esto influyó negativamente en las variables de respuesta de las plantas (menor peso seco de la parte aérea y raíz y volumen radical) y en la colonización y formación de esporas.

La diferencia entre el número de esporas por gramo entre los sustratos Bg:T.P 1-2 mm y Tur:A:V a granel fue ± 11 . Sin embargo, es posible que ambos sustratos tuvieran resultados similares ya que algunas esporas se relacionaron con poros vesícula fracturados de las partículas de tezontle. Se propone a la mezcla de bonote como sustituto de la turba en la producción de inoculante micorrízico.

2.8 Bibliografía

- Anicua-Sánchez R. 2008. Caracterización física y micromorfológica de materiales orgánicos e inorgánicos para la generación de mezclas de sustratos en la producción de *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)*. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco. México. 198 pp.
- Anicua-Sánchez, R., M.C. Gutiérrez-Castorena., P. Sánchez-García., C. Ortiz-Solorio., V.H. Volke y J.E. Rubiños-Panta. 2009. Tamaño de partícula y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y zeolita. *Agric. Téc. Méx.* 35: 147-156.
- Arenas, N. y C.S. Vavrina. 2002. Coir as alternative to peat in media for tomato transplant production. *Hort Sci.* 39: 309-312.
- Ansorena, M.J. 1994. Sustratos, Propiedades y Caracterización. Mundi Prensa Madrid. España. pp. 172.
- Bullock, P., N. Federoff., A. Jongerius., G. Stoops y T. Tursina. 1985. Handbook for Soil Thin Section Description. Wayne Research Publications, England. 152 p
- Carneiro, V.R.F., M.A. Martins., M.M.S Freitas., E. Detmann. y H.M. Vasquez. 2008. Bagaço de cana-de-açúcar como substrato para multiplicação de fungos micorrízicos arbusculares e sua influência sub estílicosantes. *Catinga* 5:189-196.
- Corkidi, L.E., B. Allen, D. Merhaut, M.F. Allen, J. Downer, J. Bohn y M. Evans. 2005. Effectiveness of commercial mycorrhizal inoculants on the growth of *Liquidambar styraciflua* in plant nursery conditions. *J. Environ. Hort.* 23: 72-76.
- Dehne, H.W. y G.F. Backhaus. 1986. The use of vesicular-arbuscular fungi in plant production. I. Inoculum production. *Z Pflanzenkrankh Pflanzenschutz* 93: 415-424.
- Drew, E. A., R. S Murray y S. E. Smith. 2003: Beyond the rhizosphere: growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes. *Plant Soil.* 251: 105-114.

- Douds D.D., L. Galvez, G. Becard y Y. Kapulnik 1998. Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytol.* 138, 27–35.
- Douds, D.D., G. Nagahashi. y P.H. Reed. 2010. On-farm production of inoculum of indigenous arbuscular micorrhizal fungi and assessment of diluents of compost for inoculum production. *Bioresour. Technol.* 101: 23 26-2330.
- Gaur, A y A. Andholeya. 2000. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. *Mycorrhiza* 10: 43-48.
- Gerdemann, J.W. y T.H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal by *Endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. British Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- de Boodt, M., O. Verdonck y I. Cappaert, 1974. Method for measuring the water release curve of organic substrates. *Acta Hort.* 37: 2054-2062.
- González-Chávez, M.C., R. Ferrera-Cerrato., A. Villegas-Monter y J.L. Oropeza. 2000. Selección de sustratos de crecimiento en microplántulas de cítricos inoculados con *Glomus* sp. *Zac-19. Terra Latinoamericana* 18: 369-377.
- González-Chávez, M.C. 2002. Producción y control de calidad de inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares. In: *Producción y Control de Calidad de Inoculantes Agrícolas y Forestales*. Pérez-Moreno J, J. Alvarado López y R. Ferrera-Cerrato (eds.). Comité Mexicano de Inoculantes Agrícolas y Forestales; Colegio de Postgraduados. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias y Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Texcoco, estado de México. pp: 36-46.
- Gutiérrez-Castorena, M.C., J. Hernández-Escobar., C.A. Ortiz-Solorio., R. Anicua Sánchez. y ME. Hernández-Lara. 2011. Relación porosidad-retención de humedad en mezclas de sustratos y su efecto en variables respuesta en plántulas de lechuga. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17: 183-196.
- Guzmán-Plazola, R.A., R. Ferrera-Cerrato, B.J.D. Etchevers y H.V. Volke. 1990. Biotecnología de la producción de inóculo micorrízico V-A. *Agrociencia, Serie agua-suelo-clima* 3: 155-181.
- Hernandez-Escobar J.L. 2009. Propiedades hídricas en mezclas de sustratos con diferentes proporciones y tamaños de partícula. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco. México. 81 pp.
- Hawkins, J.H. y E. George. 1997. Hydroponic culture of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* with *Linum usitatissimum*, L., *Sorghum bicolor* L. and *Triticum aestivum* L. *Plant Soil* 196: 143-149.

- Jakobsen, I., L.K. Abbott y A.D. Robson. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol.* 120: 371-380.
- Jarstfer, A. y D. Sylvia. 1998. Aeroponic Culture of VAM Fungi. In: *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Varma A., Hock (eds.). 2da Edition. Bertelsman Springer Publishing Groups. Germany. pp:427-440.
- Noguera, P., M. Abad., R. Puchades., A. Maquieira. y V. Noguera. 2003. Influence of particle size on physical and chemical properties of coconut coir dust as container medium. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 34 : 593-605.
- Phillips, J.B y D.S. Haymann. 1970. Improve procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. British Mycol. Soc.* 55: 158-160.
- Pineda-Marín, L. 2011. Monitoreo de la retención y absorción de agua en sustratos de diferente granulometría. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco. México. pp.85.
- Quesada-Roldan G. y C. Méndez-Soto 2005. Evaluación de sustratos para almácigos de hortalizas. *Agron. Mesoamericana* 16: 171-183.
- Ridgway, H.J., J. Kandula y A. Stewart. 2006. Optimising the medium for producing arbuscular mycorrhizal spores and the effect of inoculation on grapevine growth. *N. Z. Plant Prot.* 59: 338-342.
- Saif, S.R. 1981. The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular arbuscular mycorrhizas. I. Effect of soil oxygen on the growth and mineral uptake of *Eupatorium odoratum* L. Inoculated with *Glomus macrocarpus*. *New Phitol.* 88: 649-659.
- Santos, A.L., F.A. de Souza, J.G.M. Guerra, R.L.L. Berbara. 2000. Estabelecimento e capacidade infectiva de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum* em solo sob erosão. *Acta Bot. Bras.* 14:127-139.
- Skipper, H.D. y G.W. Smith. 1979. Influence of soil pH on the soybean-endomycorrhiza symbiosis. *Plant Soil* 53: 559-563.
- Tarbell, T.J. y R.E. Koske. 2007. Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inocula in sand/peat medium. *Mycorrhiza* 18: 51-56.

CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE *Gigaspora gigantea* Y *Funneliformis mosseae* CON PLÁNTULAS DE LECHUGA EN DOS TIPOS DE SUSTRATOS

Resumen

Para la producción de inoculante de *Gigaspora gigantea* y *Funneliformis mosseae* se probaron dos tipos de sustratos de la misma granulometría (1-2 mm). El primero elaborado con base en bonote de coco: granular (Bg) en mezcla con piedra pómez (P) y tezontle (T) en proporción 6:1:1 v/v, y una mezcla con turba: agrolita: vermiculita a granel, en proporción 2:1:1 v/v. Se utilizó un tratamiento testigo en ambos sustratos y plántulas de lechuga como planta hospedera. A cada sustrato se le determinó: pH, conductividad eléctrica, espacio poroso total, densidad aparente y real, y curva de liberación de agua. El experimento se cosechó a los 80 días después de la siembra y se evaluó número de esporas, porcentaje de colonización micorrízica, peso seco de la parte aérea y raíz, volumen radical además del porcentaje de actividad fúngica micorrízica y demanda de agua *in situ* en las plantas de lechuga micorrizadas. El sustrato que favoreció mayor número de esporas fue Bg:P:T con 0.43 esporas de *Gi. gigantea* g⁻¹ sustrato seco; sin embargo, en el análisis de la varianza no se distinguieron diferencias significativas, es decir, la variable de respuesta fue estadísticamente similar en todos los tratamientos. El porcentaje de colonización de *Gi. gigantea* fue similar en ambos sustratos y para *F. mosseae* sólo en Tur:A:V. La actividad fúngica micorrízica fue similar en ambos sustratos para ambos hongos. El peso seco de la parte aérea fue similar en Bg:P:T y Tur:A:V en los tres tratamientos de inoculación. El peso seco de la raíz fue mayor en Bg:P:T que en Tur:A:V independientemente del tratamiento de inoculación al igual que el volumen radical, el cual sólo fue diferente el tratamiento testigo en Tur:A:V. Las plantas inoculadas con *Gi. gigantea* en Bg:P:T demandaron agua en forma más continua que *F. mosseae* en ambos sustratos así como en los tratamientos testigo. Los resultados mostraron que a pesar de que los sustratos no estimularon la producción de esporas, las estructuras micorrízicas intrarradicales se mantuvieron activas, probablemente en espera de condiciones más favorables de temperatura y fue necesario más tiempo para propiciar la formación de esporas.

3.1 Introducción

El desarrollo de la vegetación está influenciado por los cambios estacionales de humedad y temperatura. Dichas condiciones y sus umbrales, determinan la tolerancia de las plantas (Ramcharan *et al.*, 1991), así como la granulometría del sustrato en condiciones de invernadero (Vargas-Tapia *et al.*, 2008). Estos efectos en conjunto, con la simbiosis micorrízica, raíz hospedera y producción de inoculante han sido poco estudiados (Gaur y Andholeya 2000; Gavito y Azcón 2012).

Diversas investigaciones han intentado determinar las propiedades físicas de los sustratos, debido a que cambian durante la producción, ya sea por el crecimiento de la planta, degradación o reorganización de la estructura de las partículas y el proceso de mineralización (Bures *et al.*, 1997). Por otro lado, es necesario realizar mediciones de liberación de agua *in situ* en forma continua, automática y precisa que de información sobre a qué tensión la planta es capaz de absorberla y que esto conlleve a programar riegos con base en la demanda de la planta y contribuir de esta manera en la disminución de los costos de producción (Pineda-Marín 2011).

Con base en los resultados obtenidos en el experimento anterior, donde se obtuvo el mayor porcentaje de colonización micorrízica y producción de esporas de *Gi. gigantea* en los sustratos Bg:P:T 1-2 y Tur:A:V a granel, en abril del 2012 se estableció el segundo experimento en condiciones de invernadero. En éste, se probaron como fuente de inoculante a los hongos micorrízico arbusculares *Gi. gigantea* y *Funneliformis mosseae*, los cuales ofrecen formas de colonización y formación de esporas contrastantes entre sí (Klironomos y Hart, 2002). Dicho experimento fue de 80 días, entre los meses de abril y julio del 2012.

3.2 Objetivo general

Comparar la producción de esporas de las especies *Gi. gigantea* y *F. mosseae* en dos tipos de sustratos de la misma granulometría con plántulas de lechuga en condiciones de invernadero.

3.2.1 Objetivos particulares

3.2.1.1 Evaluar la producción de esporas en mezclas de sustratos Tur:A:V y Bg:P:T con partículas 1-2 mm.

3.2.1.2 Comparar la demanda hídrica de plántulas de lechuga inoculadas con *Gi. gigantea* y *F. mosseae* en Bg:P:T y Tur:A:V con granulometría 1-2 mm en condiciones de invernadero.

3.3 Hipótesis general

La producción de esporas varía con relación al tipo de mezclas de sustratos de la misma granulometría.

3.3.1 Hipótesis particulares

3.3.1.1 La producción de esporas de *Gi. gigantea* es similar en los sustratos Bg:P:T y Tur:A:V con granulometría 1-2 mm con plántulas de lechuga bajo condiciones de invernadero.

3.3.1.2 La demanda de agua en las plántulas de lechuga está en función de los tratamientos de inoculación en los sustratos probados.

3.4 Materiales y métodos

Se estableció un experimento, el cual se estructuró con el diseño completamente al azar. Se consideraron tres tratamientos de inoculación micorrízica: no inoculado (NI), *F. mosseae* y *Gi. gigantea* en dos sustratos: bonote de coco granular: piedra pómez y tezontle (Bg:P:T) en proporción 6:1:1 y turba:agrolita:vermiculita (Tur:A:V) en proporción 2:1:1. El tamaño de partícula para ambos sustratos fue 1-2 mm.

3.4.1 Establecimiento del experimento

El inóculo micorrízico de *Gi. gigantea* y *F. mosseae* se propagó en macetas en arena estéril y *Plantago lanceolata* L. y *Allium cepa* L. como plantas hospederas en arena estéril. Las plantas se regaron cada tercer día con solución nutritiva Hoagland baja en fósforo [20µL]. El periodo de propagación del inoculante fue de agosto a diciembre del 2011. Después de ese tiempo, las macetas se dejaron de regar durante tres meses para propiciar la esporulación de los hongos bajo estudio. Antes de establecer los experimentos, los sustratos se esterilizaron 1 h en

una olla de presión marca PRESTO a 120 °C y 15 Lb de presión. Se utilizaron semillas peletizadas de lechuga (*Lactuca sativa* var. King Herry). El experimento constó de seis tratamientos con siete repeticiones, lo que dio lugar a 42 unidades experimentales.

Las repeticiones en cada uno de los tratamientos se organizó de la siguiente manera: tres fueron para análisis estadístico, dos para análisis micromorfológico y dos para medir la demanda de agua de las plantas de lechuga en los sustratos para cada tratamiento de inoculación. La demanda de agua requerida a medida que las plantas se iban desarrollando se evaluó utilizando sensores de humedad en kilopascales (kpa). El sensor (prehidratado por \pm 24 h). se colocó una vez que el sustrato se saturó (tensión cero). Las plantas se regaron, con solución nutritiva Hoagland, diariamente los primeros 10 días y posteriormente cuando perdían humedad (tensión diferente a cero).

El experimento se estableció entre los meses de abril a julio del 2012, en invernadero (temperatura mínima de 16 °C y máxima de 50.8 °C, con intensidad luminosa de 19426.408 W·cm⁻² (σ = 26050.873), en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo.

3.4.2 Variables de respuesta a evaluar

Las variables que se evaluaron fueron: capacidad de retención de humedad y temperatura de los sustratos que se utilizaron mientras que las variables de crecimiento las plántulas de lechuga fueron: peso seco de la parte aérea y raíz, y volumen radical. Con respecto a la calidad del inoculante se midió el porcentaje de colonización micorrízica así como número de esporas. La metodología que se empleó para este propósito está descrita en la sección dos. Adicionalmente se midió el porcentaje de raíz colonizada activa, a través de la tinción vital descrita a continuación.

3.4.2.1 Tinción vital

Para cuantificar la actividad fúngica micorrízica en la raíz hospedera, unas horas antes de la cosecha del experimento, se preparó el reactivo de succinato deshidrogenasa (SDH) en condiciones de oscuridad.

Las raíces colectadas para esta prueba, después de lavarse, se colocaron en tubos con SDH y se resguardaron en oscuridad por 24 h. Transcurrido dicho tiempo, la solución se eliminó y la reacción se detuvo al agregar Cloralex[®] al 1% durante 5 min. Posteriormente, las raíces se enjuagaron con agua destilada colocándose en fucsina ácida [0.1% en glicerol al 50%] por un tiempo mínimo de 24 h; éstas fueron montadas en portaobjetos y observadas al microscopio con objetivo 40x. La tinción vital se calculó tomando en consideración el porcentaje de raíz colonizada, a través de la observación de las estructuras micorrízicas intrarradicales activas en el campo de observación, con relación de segmentos totales evaluados (González-Chávez *et al.* 2007).

3.4.2.2 Análisis de datos

El porcentaje de colonización y actividad fúngica micorrízica se evaluaron mediante estadísticos descriptivos de tendencia central, de dispersión, así como gráficas de barras. Para determinar los sustratos que propiciaron mayor colonización micorrízica se hizo un análisis de la varianza ($\alpha \leq 0.05$) y pruebas de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). El peso seco de la parte aérea y de radical y volumen radical, se analizaron con estadísticos descriptivos, ANOVA del Diseño Completamente al Azar ($\alpha \leq 0.05$) y un análisis de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Para cada uno de los análisis, el programa estadístico que se utilizó fue el Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0. La demanda de agua en los sustratos durante el desarrollo de las plántulas de lechuga se representó con gráficas descriptivas con líneas de tendencia.

3.5. Resultados

3.5.1 Variables de respuesta de la planta hospedera

3.5.1.1 Porcentaje de colonización micorrízica

Se encontraron diferencias en la capacidad de colonización entre *F. mosseae* y *Gi. gigantea* en Bg:P:T. pero no en Tur:A:V. En la Figura 3.1 se muestran las estructuras fúngicas micorrízicas que los HMA desarrollaron en raíces de lechuga en ambos sustratos. El análisis de la varianza (Anexo 3.1) muestra que hubo diferencias altamente significativas. En cuanto al porcentaje de raíz colonizada por

tinción vital no se encontraron diferencias en la actividad fúngica micorrízica entre tratamientos, ni sustratos.

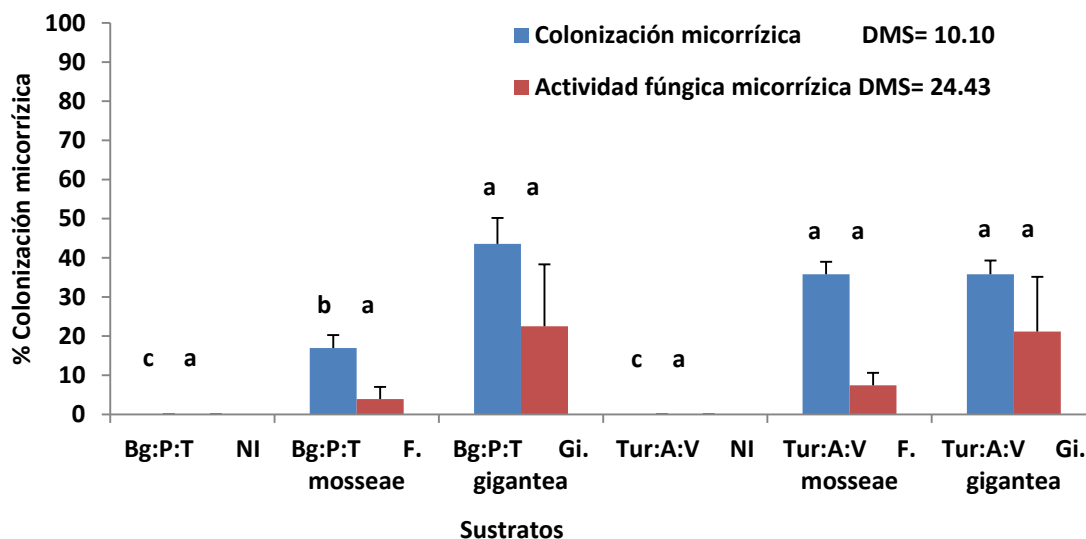


Figura 3.1. Porcentaje de colonización total y vital de los HMA probados en sustratos. DMS= diferencia mínima significativa.

En la Figura 3.2 se observan las estructuras fúngicas intrarradicales de las plantas de lechuga desarrolladas en ambos sustratos.

3.5.1.2 Número de esporas

En el número esporas no se distinguieron diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación en ambos sustratos (Anexo 3.1). Se encontró variabilidad en el número de esporas en las repeticiones de cada tratamiento inoculado con *F. mosseae* y *Gi. gigantea* en Bg:P:T. En el sustrato Tur:A:V, no se detectaron esporas en ninguno de los tratamientos. El coeficiente de variación fue alto (más de 400%) lo que indicó la variabilidad en los tratamientos entre ambos sustratos (Figura 3.3).

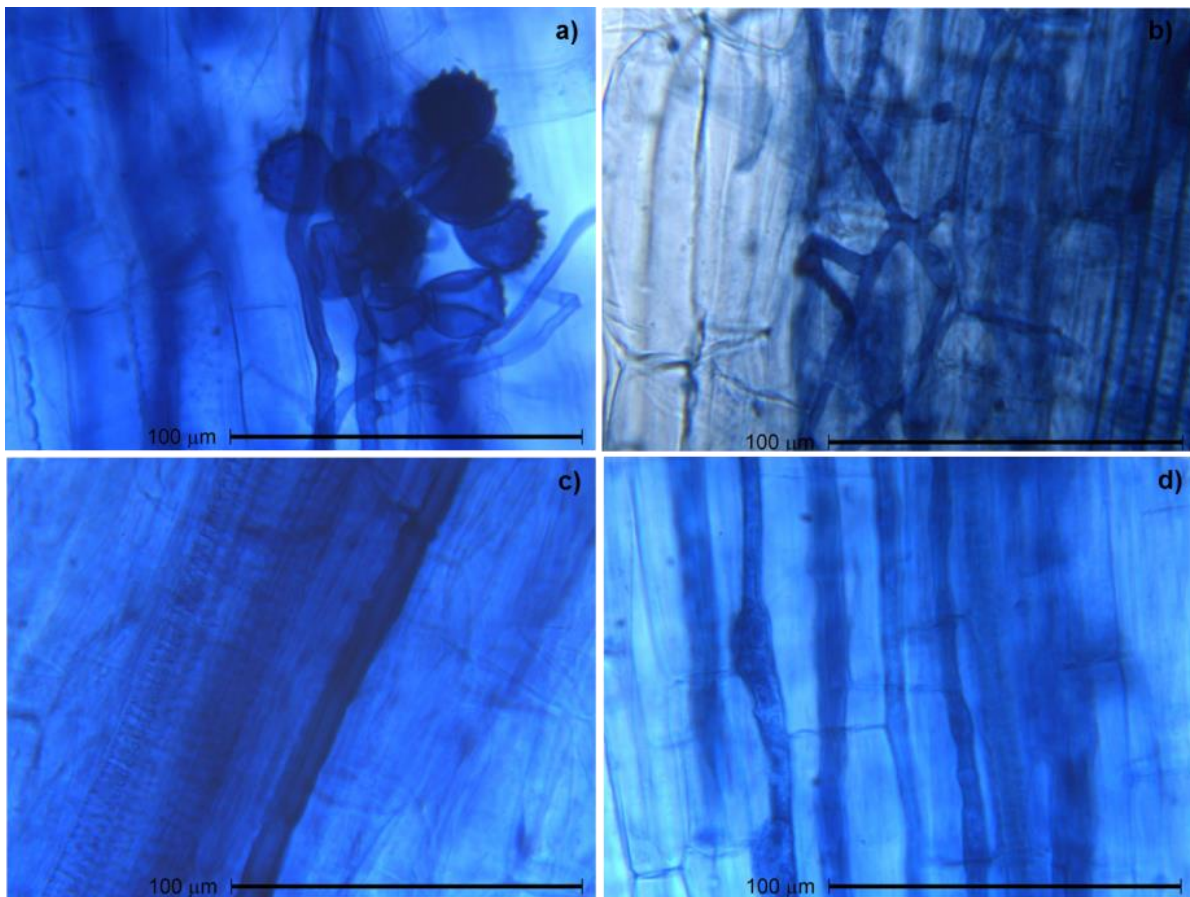


Figura 3.2 Colonización micorrízica a) células auxiliares de *Gigaspora gigantea*-Bg:P:T. Hifas de b) *Gigaspora gigantea*-Tur:A:V, c) *Funneliformis mosseae*-Bg:P:T y d) *Funneliformis mosseae*-Tur:A:V.

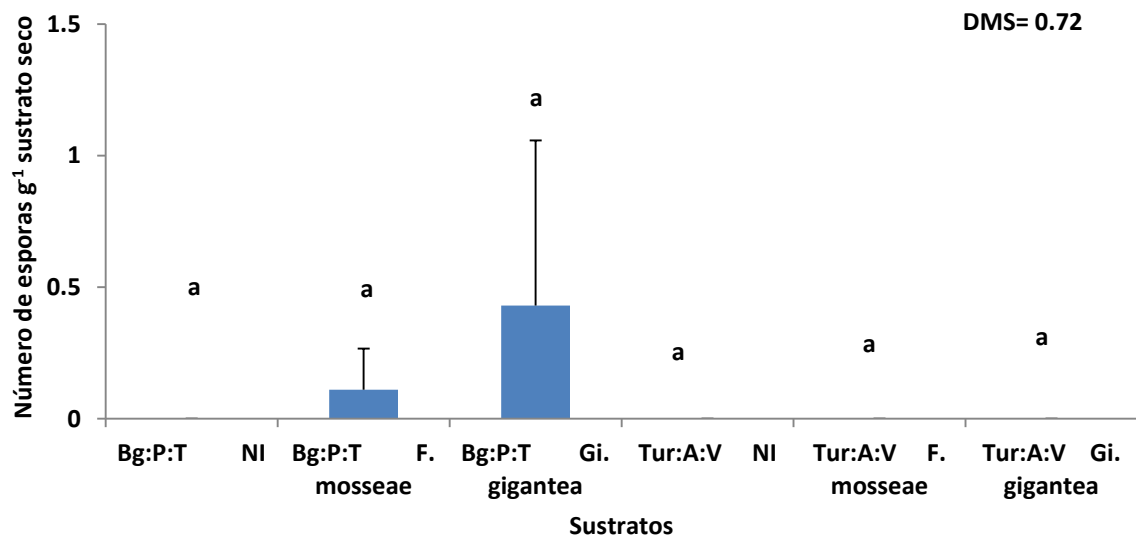


Figura 3.3. Número de esporas en los tratamientos de inoculación, en los sustratos probados. DMS= diferencia mínima significativa.

3.5.1.3 Peso seco de la parte aérea

El peso seco de la parte aérea entre los tratamientos fue estadísticamente similar en todos los tratamientos (Anexo 3.1, Figura 3.4).

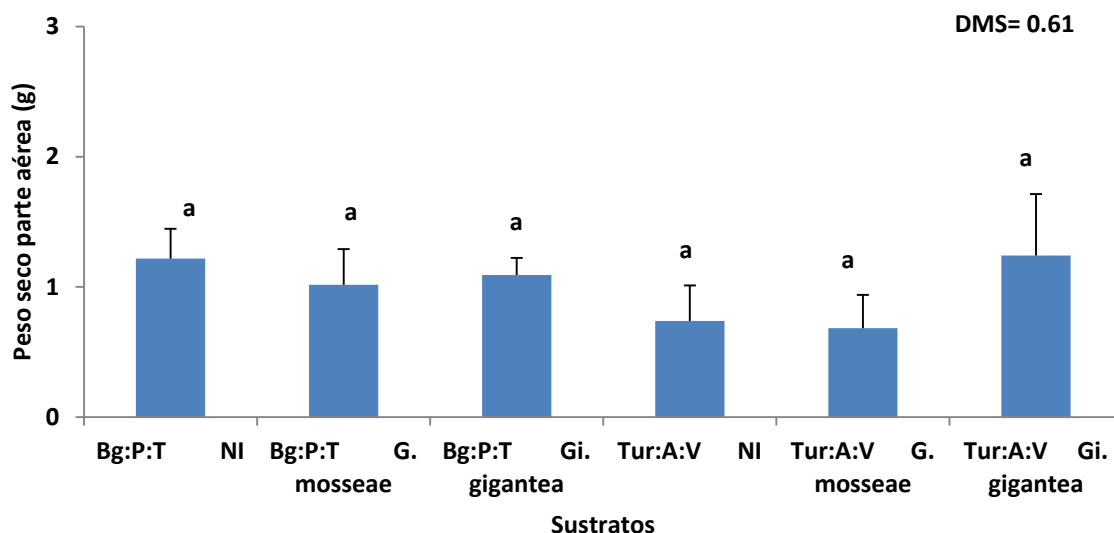


Figura 3.4. Peso seco de la parte aérea de plantas de lechuga de los tratamientos de inoculación en los sustratos. DMS= diferencia mínima significativa.

3.5.1.4 Peso seco de la raíz

El peso seco de la raíz fue similar entre los tratamientos de inoculación en Bg:P:T, lo que sugiere el efecto del sustrato en esta variable de respuesta. En Tur:A:V se registraron los valores más bajos (Figura 3.5). El análisis de la varianza resultó altamente significativo. En la Figura 3.7 se muestra el efecto de los sustratos sobre las raíces, lo que sugiere que la colonización micorrízica no influyó ni en el volumen, ni en el peso seco de la raíz.

3.5.1.5 Volumen radical

El volumen radical fue similar en el sustrato Bg:P:T independientemente del tratamiento de inoculación. En Tur:A:V el tratamiento no inoculado tuvo los valores más altos en esta variable de respuesta (Figura 3.6). El análisis de la varianza (Anexo 3.1) mostró que existieron diferencias altamente significativas en al menos uno de los tratamientos. La Figura 3.7 muestra el efecto de los sustratos, lo que sugiere que la colonización micorrízica no influyó en esta variable de respuesta.

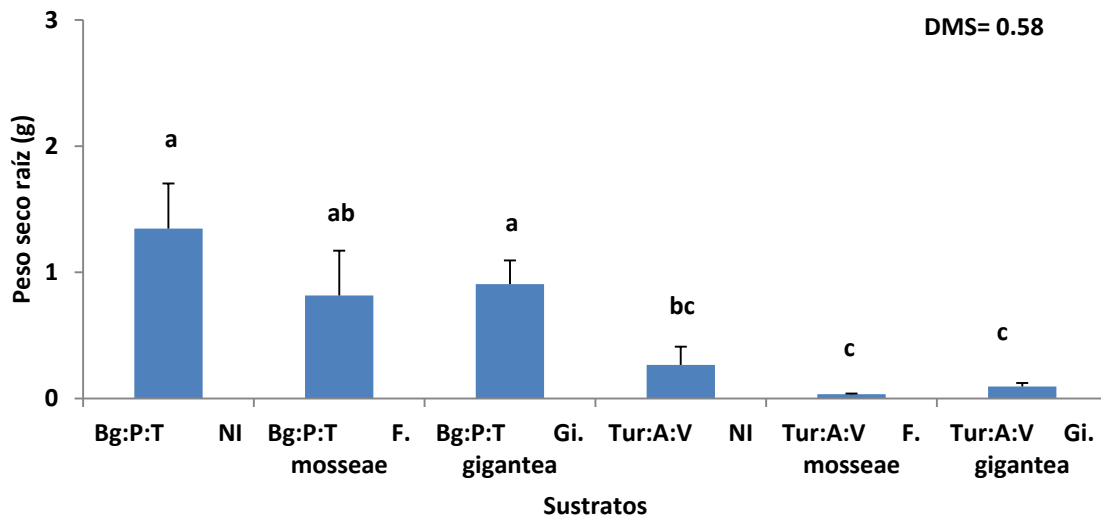


Figura 3.5 Peso seco de la raíz de plantas de lechuga de los tratamientos de inoculación. DMS= diferencia mínima significativa

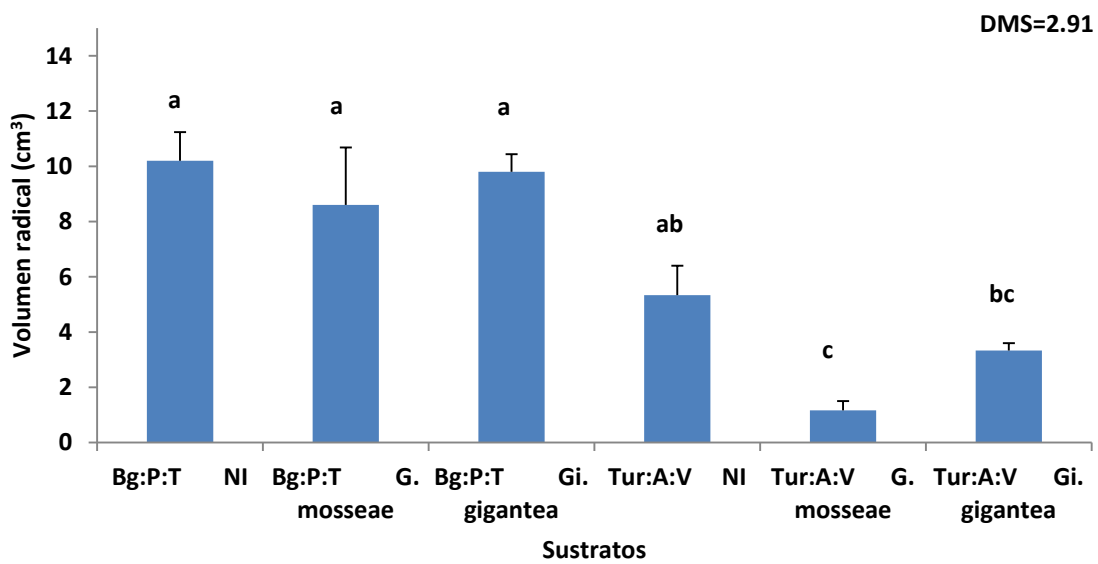


Figura 3.6. Volumen radical de plantas de lechuga de los tratamientos de inoculación en los sustratos probados. DMS= diferencia mínima significativa.

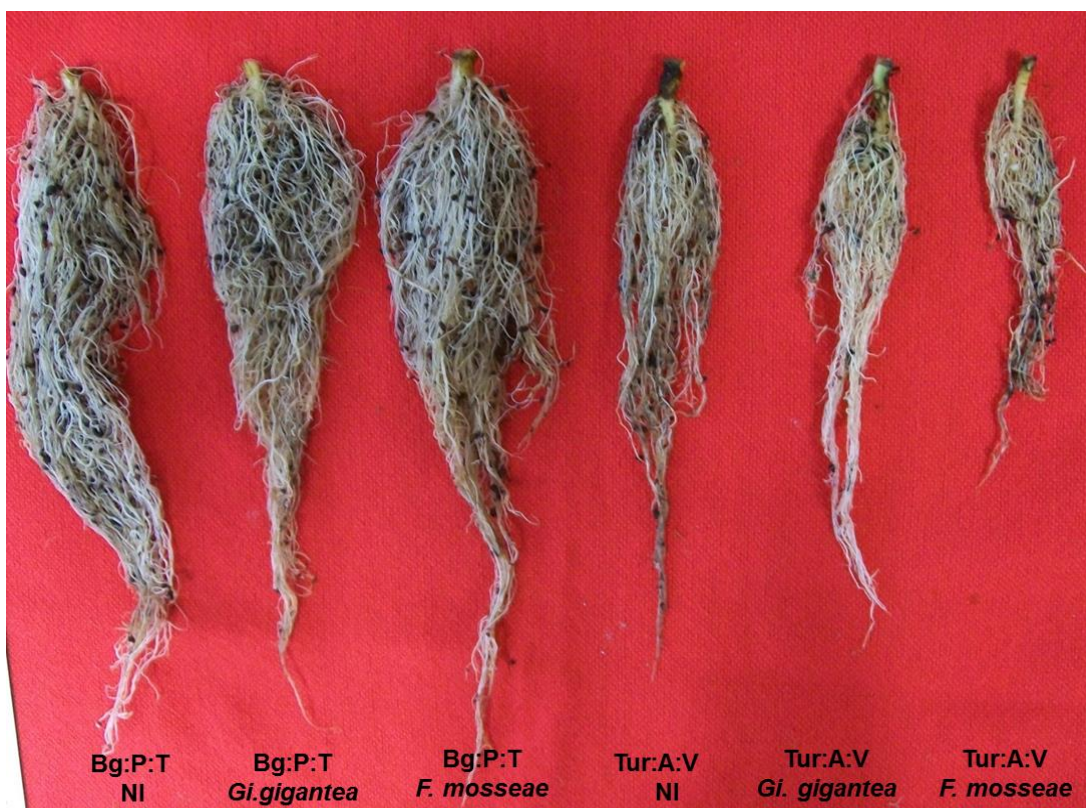


Figura 3.7 Desarrollo de raíces de lechuga en los tratamientos de inoculación en los sustratos con granulometría 1-2 mm.

3.5.2 Propiedades físicas y químicas de los sustratos

Las propiedades físicas y químicas de los sustratos Tur:A:V y Bg:P:T (1-2 mm) en el Cuadro 3.1. Aunque el pH de ambos sustratos se consideran como ácidos, el valor más bajo correspondió a Tur:A:V (5.5), mientras en lo que a CE se refiere, esta fue menor en Bg:P:T.

Cuadro 3.1. Propiedades físicas y químicas de los sustratos utilizados.

Sustrato	pH	CE	Dr	Da	EPT
		$\mu\text{mhos. cm}^{-2}$	g. cm^{-3}	g. cm^{-3}	%
Tur:A:V	5.5 (0.2)	94.4 (5.5)	1.1 (0.1)	0.2 (0.02)	84.4 (1.6)
Bg:P:T	6.2 (0.01)	56.9 (7.1)	2.4 (0.3)	0.4 (0.03)	83.8 (0.2)

El valor entre paréntesis representa la desviación estándar

3.5.2.1 Dinámica de temperatura en sustratos durante el desarrollo de plantas de lechuga

Durante el desarrollo del experimento se detectaron fluctuaciones en la temperatura de los sustratos, en los meses de mayo-julio se observaron las temperaturas más altas (40-50 °C) entre las 14 y 17 horas y las más bajas (10-12°C) de 0-8 horas (Figura 3.8).

Los sustratos que se probaron tuvieron capacidad de retención de humedad similar a las diferentes tensiones (Figura 3.9).

Independientemente del tipo de sustrato empleado se detectó que la demanda de agua 12 días después de la instalación de los sensores fue estadísticamente similar en todos los tratamientos (Figuras 3.10-3.15). Sin embargo, después de ese tiempo hubo diferencias entre los tratamientos de inoculación en los requerimientos de agua.

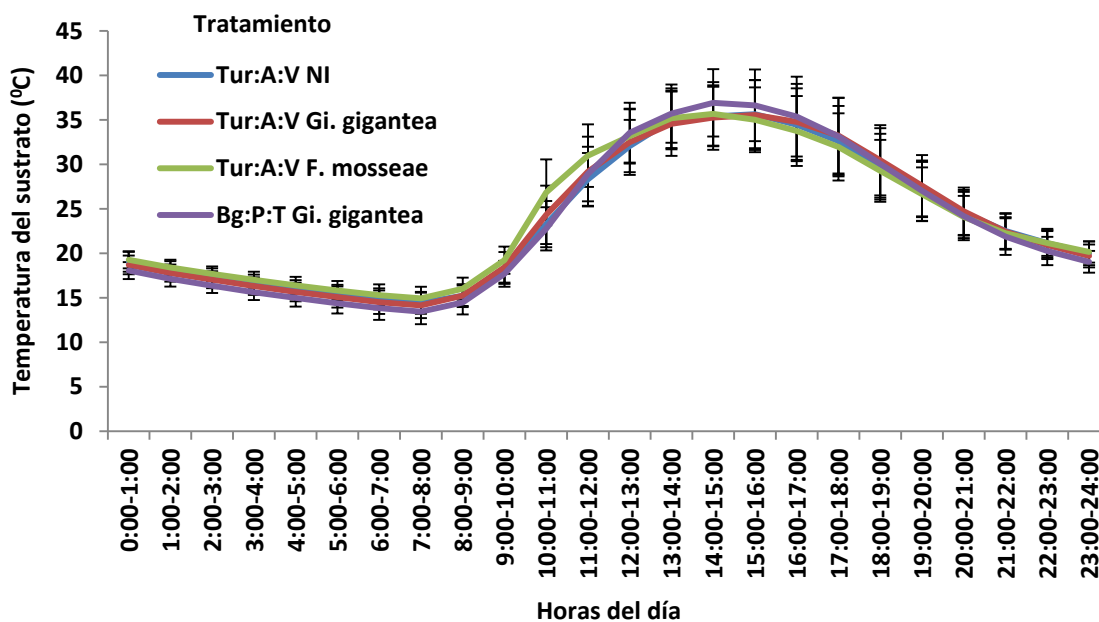


Figura 3.8 Fluctuación diaria de la temperatura de los sustratos durante el desarrollo del experimento (mayo-junio).

3.5.2.2 Cinética de demanda de agua en sustratos durante el desarrollo de plántulas de lechuga

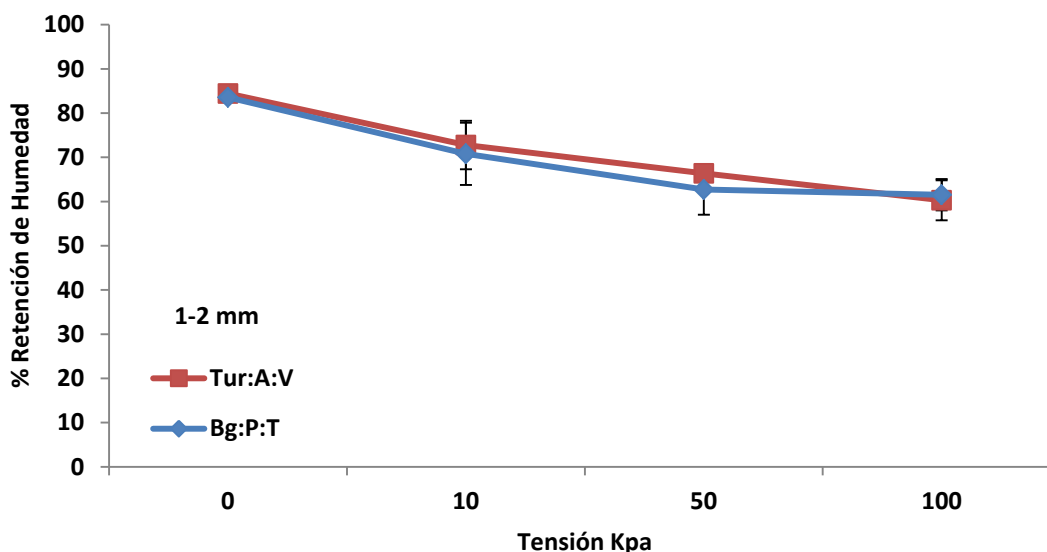


Figura 3.9 Capacidad de retención de humedad de los sustratos probados a diferentes tensiones después de 24 h.

Las plantas no inoculadas mantenidas en Tur:A:V, demandaron agua en periodos más prolongados que las plantas inoculadas, requiriéndose únicamente 10 riegos durante el periodo de evaluación, lo que sugiere que este sustrato mantuvo la humedad con mayor fuerza y la necesidad de agua que las plantas tuvieron fue de 15 ± 2 Kpa (Figura 3.10).

En tanto, las plantas no inoculadas y mantenidas en Bg:P:T, la demanda de agua fue mayor, tal como los demuestran los 14 riegos aplicados. La necesidad de agua en los tratamientos con este sustrato ocurrió generalmente a la tensión de 10 ± 4 Kpa, excepto en los días 7, 12 y 16 días, cuya tensión fue superior a los 20 Kpa (Figura 3.11).

Plantas de lechuga inconuladas con *F. mosseae* que se desarrollaron en Tur:A:V, demandaron agua en periodos cortos, con un total de 13 riegos en contraste con los 10 requeridos en el testigo (Tur:A:V sin hongo). Lo anterior sugiere que la planta se deshidrató con facilidad conforme se desarrolló en este sustrato. La necesidad de agua en cada ocasión fue de 10 ± 2 Kpa (Figura 3.12).

Las plantas inoculadas con *F. mosseae* en Bg:P:T tuvieron comportamiento similar (14 riegos, Figura 3.13) a las plantas inoculadas con el mismo hongo y que crecieron en Tur:A:V (Figura 3.13), ya que estas también demandaron agua en periodos cortos.

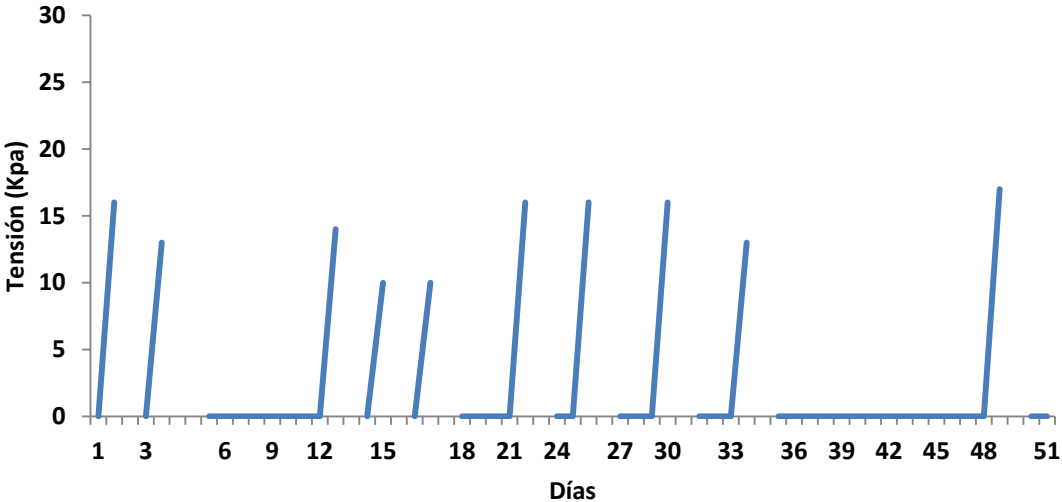


Figura 3.10. Demanda de agua de plantas de lechuga no micorrizadas en Tur:A:V.

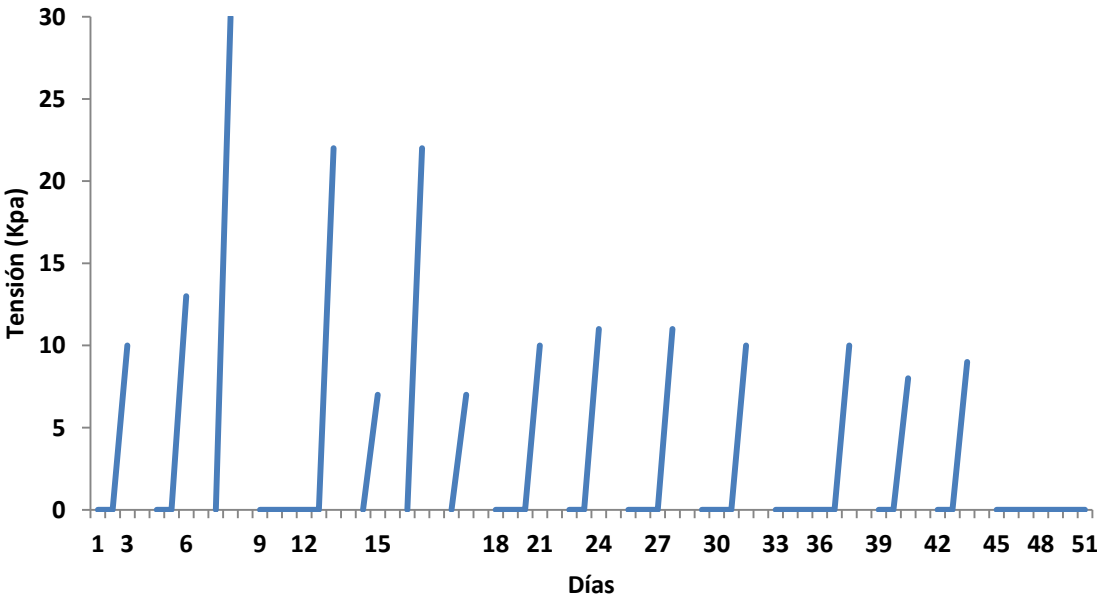


Figura 3.11. Demanda de agua de plantas de lechuga no micorrizadas en el sustrato Bg:P:T.

Las plántulas de lechuga inoculadas con *Gi. gigantea* mantenidas en Tur:A:V, demandaron únicamente 10 riegos y la necesidad de agua en cada ocasión fue de 15 ± 2 Kpa (Figura 3.14).

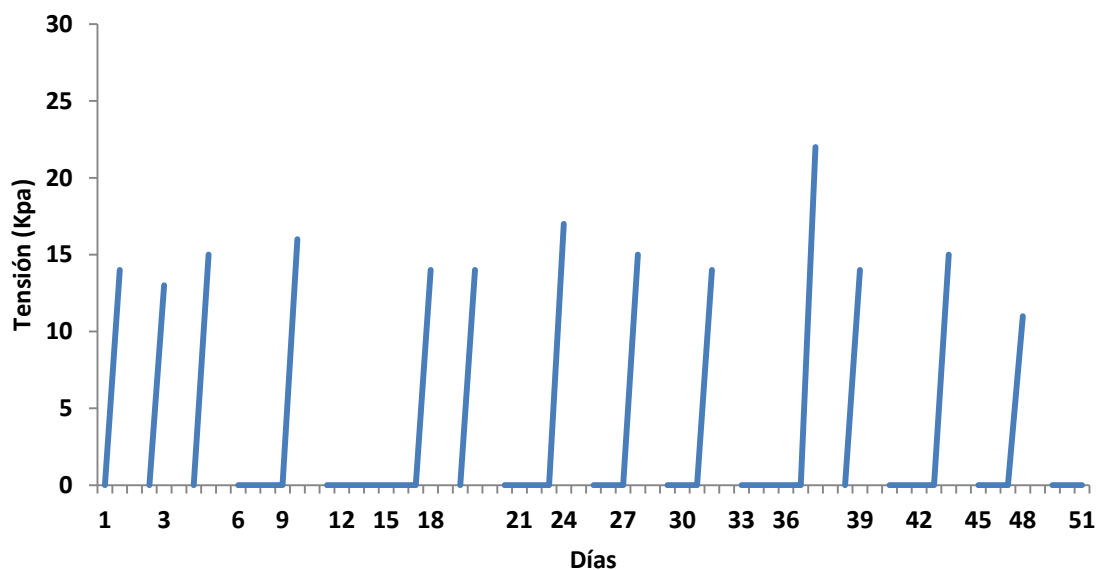


Figura 3.12. Demanda de agua de plantas de lechuga inoculadas con *Funneliformis mosseae* en Tur:A:V.

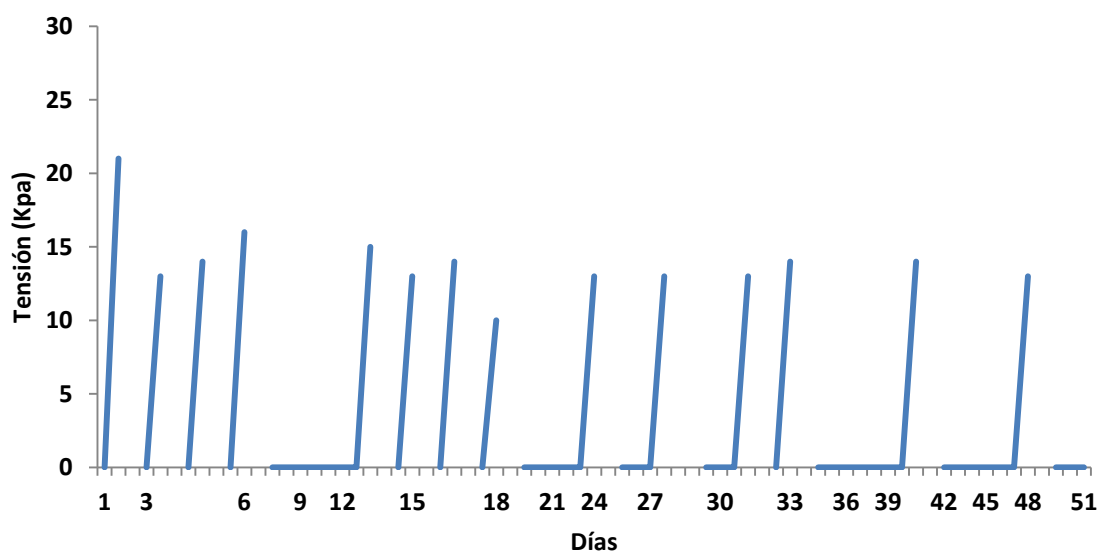


Figura 3.13. Demanda de agua de plantas de lechuga en Bg:P:T del tratamiento inoculado con *Funneliformis mosseae*.

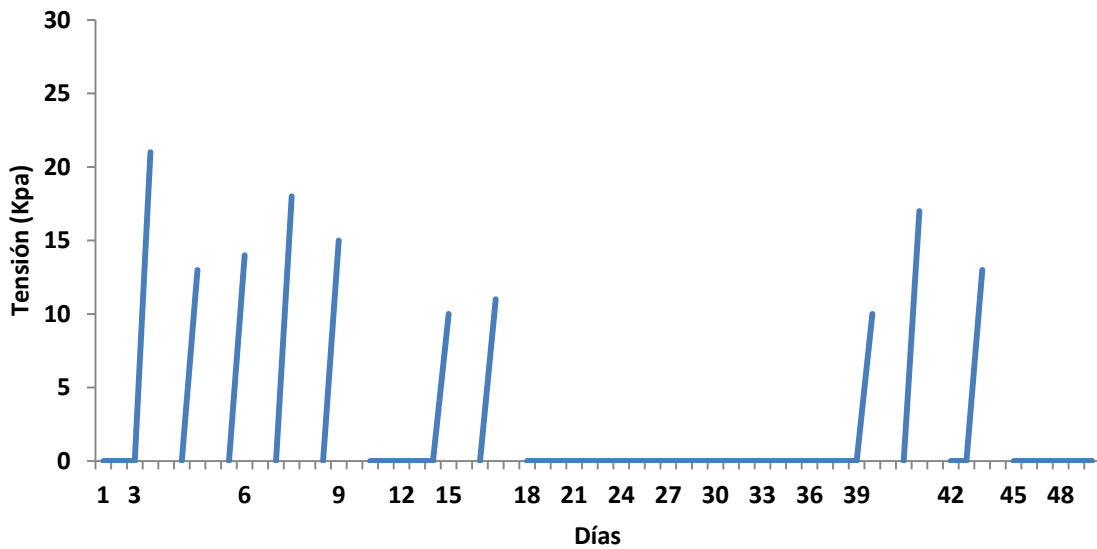


Figura 3.14. Demanda de agua de plantas de lechuga en Tur:A:V del tratamiento inoculado con *Gigaspora gigantea*.

Las plántulas inoculadas con *Gi. gigantea* que se desarrollaron en Bg:P:T tuvieron comportamiento similar a cuando crecieron en Tur:A:V (10 y 11 riegos respectivamente). La demanda de agua fue menos continua (5 ± 2 días) con una tensión constante de 12 kpa (Figura 3.15).

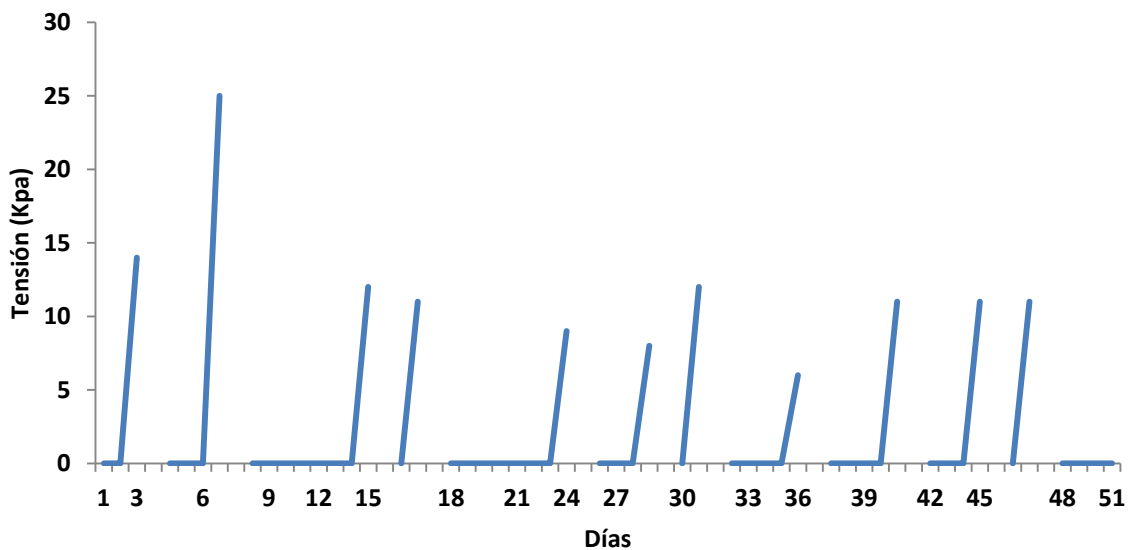


Figura 3.15. Demanda de agua de plantas de lechuga inoculadas con *Gigaspora gigantea* en el sustrato Bg:P:T.

3.6 Discusión

La condición de invernadero para el desarrollo de hortalizas en el periodo de primavera-verano, influye en la temperatura al igual que en la radiación, lo cual propicia incremento en la respiración, transpiración y el proceso fotosintético de las plantas (Langlais y Ryckewaert, 2002). Diaz *et al.* (1978) reportaron que el cultivo de la lechuga requiere temperatura mínima de 12 °C, óptima 15 a 18 °C y máxima de 21 a 24 °C.

En la presente investigación la temperatura mínima fue 16 °C y la máxima 50.8 °C. Ésta última registrada entre las 12 a 17 h, superando el umbral máximo de tolerancia por más del 100%. Tal condición ambiental además de incrementar la temperatura de los sustratos, así como los requerimientos de agua durante el desarrollo de las plántulas, influyó en la colonización micorrízica y en la formación de esporas de ambos géneros fúngicos. Sin embargo, el sustrato que favoreció la formación de esporas fue Bg:P:T, a *Gi. gigantea* aunque este resultado fue estadísticamente similar entre los demás tratamientos.

Haugen y Smith 1992, determinaron el efecto de la temperatura y la habilidad de *R. intraradices* de un inóculo comercial, para colonizar raíces de soya, en invernadero. Las temperaturas que se probaron fueron: 22 °C, 30 °C, y 38 °C y encontraron que la colonización se favoreció a 30 °C a los 14 días después de la siembra. En tanto que para nuez, la mayor colonización se obtuvo a 22 °C (59%) y la menor a 38 °C con <10% de colonización.

En la presente investigación la colonización micorrízica de las plantas de lechuga inoculadas tanto con *Gi. gigantea* como con *F. mosseae* fue de 40%-50% en ambos sustratos, con excepción de *F. mosseae* en Bg:P:T (10%-15%). Lo anterior denotó no sólo la capacidad de los HMA para colonizar las plántulas de lechuga, sino la influencia de la naturaleza de los componentes del sustrato que se usaron para estimular o no, la colonización y formación de esporas.

Hart y Reader, (2002), mencionaron que miembros de la familia Gigasporaceae colonizan la raíz de su planta hospedadora más lentamente que miembros de la familia Glomaceae. Mientras las esporas de *Gigaspora* requieren condiciones específicas para su germinación *Glomus* coloniza la raíz a través de micelio extrarradical y segmentos de raíz colonizadas. Estas diferencias en germinación y

colonización entre géneros podrían representar una desventaja de *Gigaspora* con respecto a *Glomus*. En el presente estudio el porcentaje de colonización fue significativamente más alto para *Gi. gigantea* que para *F. mosseae* en Bg:P:T. Lo anterior indica la influencia positiva del sustrato para esta variable de respuesta bajo estas condiciones.

En la evaluación de la colonización de los HMA en la raíz hospedera, la técnica de tinción por Azul de Tripano otorga una visión general de la colonización fúngica, con base sólo en la presencia de las estructuras micorrízicas intrarradicales. Sin embargo, no indica con claridad cómo se encuentra la colonización metabólicamente activa (Utobo *et al.*, 2011). Ésta se puede conocer de manera complementaria en relación al crecimiento de la planta hospedera. En la presente investigación, el porcentaje de raíz colonizada activa no fue significativamente diferente entre los tratamientos de inoculación en ambos sustratos. Lo anterior se debió principalmente a la variación entre las repeticiones de los tratamientos; sin embargo, se puede observar que la colonización micorrízica en la raíz hospedera se mantuvo activa.

En la presente investigación los sustratos Bg:P:T y Tur:A:V (1-2 mm) no favorecieron la formación de esporas. Gaur y Andholeya, (2000) obtuvieron la mayor producción de éstas y mayor porcentaje de colonización en partículas de arena con diámetro 0.50-0.78 mm para *R. intraradices*.

Por otro lado, Drew *et al.* (2003) reportaron que con *R. intraradices* se produjo mayor cantidad de hifas externas en arena con tamaño de partícula de 0.10 mm. *R. intraradices* y *F. mosseae*, crecieron más rápidamente en el sustrato con 0.10 mm y más lento en la granulometría de 0.38 mm. Lo anterior sugiere que en la presente investigación la colonización y producción de esporas por parte de *F. mosseae* pudo estar mayormente favorecido en sustratos con granulometría menor a 1 mm.

La formación de esporas fue estadísticamente similar en ambos sustratos, esto pudo ser consecuencia del alto coeficiente de variación entre las repeticiones de los tratamientos y de la temperatura elevada registrada durante el experimento.

En el sustrato Tur:A:V, con excepción del peso seco de la parte aérea, existieron diferencias significativas en el volumen radical y peso seco de la raíz, donde el

tratamiento no inoculado presentó los mayores resultados. Este sustrato a pesar de estimular menor desarrollo de la raíz en comparación con Bg:P:T, en el porcentaje de colonización, no existieron diferencias estadísticas entre ambos sustratos, con excepción de *F. mosseae* en Bg:P:T. En tanto que efecto del sustrato Bg:P:T sobre el peso seco de la raíz y volumen radical fue mayor que Tur:A:V, independientemente del tratamiento de inoculación.

Hart y Reader (2005) mencionaron que debido a que las fuentes de inóculo de *Glomus* sp. (esporas, micelio externo [tubo germinativo, hifas corredoras y de absorción, red micelial] y raíces colonizadas) son mayores a *Gigaspora* sp.; por tanto *Glomus* tendría mayor superficie de contacto y capacidad infectiva para colonizar a su planta hospedera y la colonización se daría de una manera más inmediata en comparación con *Gigaspora*. Sin embargo, estos autores no consideraron la influencia del sustrato utilizado, el cual fue una mezcla de arena sílica y ceniza de arcilla (10:1 v/v) ni su granulometría. Ellos reportaron que *F. intraradices* y *Claroideoglomus etunicatum* (anteriormente género *Glomus*) tuvieron mayor capacidad infectiva que *Gi. gigantea*.

En el experimento del capítulo anterior, el análisis de las secciones delgadas mostró que las esporas de *Gi. gigantea*, se relacionaron con poros fracturados de las partículas inorgánicas de tezontle en Bg:P:T con granulometría de 1-2 mm, con lo que se supondría que el número de esporas tanto de *G. gigantea* como de *F. mosseae* pudo subestimarse.

En cuanto al requerimiento de agua, el tratamiento Tur:A:V sin micorríza tuvo menor requerimiento que Bg:P:T (NI), donde incluso, la fuerza para absorberla en el desarrollo de las plántulas fue mayor durante los primeros días. Esta respuesta se observó nuevamente en los sustratos inoculados con *F. mosseae*, sin embargo, el requerimiento de agua fue similar conforme transcurrieron los días. En los sustratos inoculados con *Gi. gigantea*, El sustrato Tur:A:V requirió de sólo un riego más que Bg:P:T (11 y 10 riegos, respectivamente) lo que demuestra la capacidad de *Gi. gigantea* para optimizar el agua del sustrato bajo las condiciones imperantes en el experimento.

Durante la presente investigación, con respecto a los sensores que se utilizaron para detectar la demanda de agua, estos presentaron algunos inconvenientes,

asociados a la falta de energía eléctrica en días consecutivos y actividad sísmica durante este periodo. Situación que explicaría la imprecisión en la detección de agua en los sensores presentes en los tratamientos Tur:A:V Ni y *Gi. gigantea*.

Se recomiendan más estudios en relación a los requerimientos de agua mediante el uso de sensores y que involucren mayor número de repeticiones para obtener datos representativos en cuanto a la demanda de agua de la planta hospedera y cómo los microorganismos asociados a su rizosfera contribuyen en el desarrollo de ésta, en diferentes sustratos, durante la producción de inoculante micorrízico.

3.7 Conclusiones

La producción de esporas de las especies *F. mosseae* y *Gi. gigantea* bajo las condiciones del estudio, es similar entre los sustratos.

El sustrato Bg:P:T estimuló la colonización micorrízica en las raíces de lechuga fue similar entre los tratamientos *Gi. gigantea* (Bg:P:T y Tur:A:V) y *F. mosseae*-Tur:A:V.

Las plántulas de lechuga demandan mayor cantidad de agua el sustrato Bg:P:T independientemente del tratamiento de inoculación.

El desarrollo de la planta hospedera se afectó principalmente por el tipo de sustrato y fue independientemente del tratamiento de inoculación.

La alta temperatura no afectó la colonización y viabilidad de las estructuras micorrízicas intrarradicales presentes en Bg:P:T.

A pesar de la alta temperatura y la baja retención de humedad en los sustratos empleados, se detectó colonización activa de estructuras intrarradicales, de los HMA en ambos sustratos.

3.8 Bibliografía

Burés, S. 1997. Sustratos. Ediciones Agrotécnicas. Madrid, España. pp. 342.

Díaz, T., R.D. Delgado y J. Carrillo. 1978. Lechuga: requerimientos de cultivo. Cultivos Hortícolas, Investigación y Producción. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Araure (Venezuela). Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Región Centro Occidental. pp. 77

- Drew, E. A., R.S. Murray y S.E. Smith. 2003: Beyond the rhizosphere: growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes. *Plant Soil*. 251: 105-114.
- Gavito M.E. y C. Azcón-Aguilar. 2012. Temperature stress in arbuscular mycorrhizal fungi: a test for adaptation to soil temperature in three isolates of *Funneliformis mosseae* from different climates. *Agr. Food Sci*. 21: 2-11.
- Gaur, A. y A. Andholeya. 2000. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. *Mycorrhiza* 10: 43-48.
- González-Chávez, M.C., A. Alarcón y R. Ferrera-Cerrato, 2007. Manual de Métodos para la Investigación y aplicación de hongos micorrízicos Arbusculares en laboratorio y Campo. In: *Ecología de la Raíz*. Fuentes-Dávila G. y R. Ferrera-Cerrato, (eds.). Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C. Colegio de Postgraduados. Texcoco, estado de México. pp. 144.
- Haugen, L.M. y Smith S.E. 1992. The effect of high temperature and fallow period on infection of mung bean and cashew roots by the vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Plant Soil*. 145: 71–80.
- Hart, M. M. y R. J. Reader. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*. 153: 335-344.
- Hart, M. M. y R. J. Reader. 2005. The role of the external mycelium in early colonization for three arbuscular mycorrhizal fungal species with different colonization strategies. *Pedobiologia* 49: 269-279.
- Klironomos, N.J. y M.M. Hart. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12:181-184.
- Langlais, C. y P. Ryckewaert. 2002. Guide to Protected Horticultural Crops in the Tropical Humid Zone. CIRAD, Montpellier, France. pp. 91.
- Pineda-Marín, L. 2011. Monitoreo de la retención y absorción de agua en sustratos de diferente granulometría. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco. México. pp.85.
- Ramcharan, C., D.L. Ingram, TA. Nell, y J.E. Barrett. 1991. Fluctuations in leaf carbon assimilation as affected by root-zone temperature and growth environment. *Hort Sci*. 26: 1200-1202.
- Vargas-Tapia, P., J.Z. Castellanos-Ramos., J.J. Muñoz-Ramos., P. Sánchez-García., L. Tijerina-Chávez., R. M. López-Romero., C. Martínez-Sánchez y J. L. Ojodeagua-Arredondo. 2008. Efecto del tamaño de partícula sobre algunas propiedades físicas del tezontle de Guanajuato, México. *Agric. Téc. Méx*. 3: 323-331.

Utobo, E.B., E.N. Ogbodo. y C. Nwogbag. 2011. Techniques for extraction and quantification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Libyan Agric. Res. Cen. J. Intl.*, 2: 68-78.

4 CONSIDERACIONES FINALES

4.1 Discusión general

Aunque las propiedades físicas y químicas de los sustratos son características determinantes para el desarrollo del cultivo (Bosa *et al.*, 2003; Zanetti *et al.*, 2003) y propicié o no, el establecimiento de la simbiosis micorrízica y formación de esporas (Saif, 1981), es importante no soslayar la forma y capacidad del contenedor que se utilice para este propósito (Ladis, 1990), así como considerar las condiciones ambientales de humedad, luz y temperatura (Haugen y Smith 1992), y las del sustrato a utilizar.

En el experimento uno, donde la temperatura ambiental fluctuó entre 12-21 °C con intensidad luminosa de 5820.0 W·cm⁻², existieron marcadas diferencias tanto en las variables de respuesta de la planta hospedera (peso seco parte aérea y raíz y volumen radical), como en la capacidad de colonizar a la raíz hospedera y formar esporas de *Gi. gigantea* en comparación con el segundo experimento donde la temperatura fluctuó 16 °C-50.8 °C, con intensidad luminosa de 19426.4 W·cm⁻², en Bg:P:T 1-2 mm. Así mismo, en el primer experimento se mostró que en sustratos con ambos tipos de bonote y granulometría de < 0.6 mm produjeron mayor efecto en las variables de respuesta en el crecimiento de la lechuga; sin embargo, no se propició en forma óptima la colonización ni la formación de esporas de *Gigaspora gigantea*, sólo sustratos con granulometría de 0.6-1 mm para colonización así como en Bg:P:T, Tur:A:V a granel además para la formación de esporas.

Con respecto a lo anterior, la mayoría de las investigaciones relacionadas con producción de inóculo en sustratos, donde se han obtenido mayor porcentaje de colonización y esporas de *R. intraradices* han sido 0.50-0.78 mm (Gaur y Andholeya, 2000), mayor cantidad de hifas externas en el sustrato de 0.10 mm de *R. intraradices* y *F. mosseae* (Drew *et al.* 2003) ambos utilizando como sustrato arena; y Ridgway *et al.* (2006) en 0.50-1.0 mm de arena sílica en mezcla con piedra pómez (70:30 v/v), con HMA del género *Glomus*. Lo anterior sugiere que los sustratos probados con granulometría de < 0.6 mm, serían propicios para producción de inoculante de HMA de la familia Glomeraceae. Se sugiere realizar análisis micromorfológico para relacionar la interacción entre el desarrollo de la

raíz hospedera y estructuras micorrízicas extrarradicales con las partículas del sustrato.

En el experimento dos, donde se comparó la capacidad de Bg:P:T y Tur:A:V ambos con granulometría de 1-2 mm, para estimular la colonización y la formación de esporas de *F. mosseae* y *Gi. gigantea* colonizaron a las raíces de lechuga de manera similar en Tur:A:V. Sin embargo, bajo las condiciones ambientales en que se desarrolló la planta hospedera y los hongos no se obtuvo abundante producción de esporas en comparación con el primer experimento con *Gi. gigantea*. El sustrato que demandó agua con mayor frecuencia fue Bg:P:T (1-2 mm), lo que sugiere que a medida que se desarrollaron la planta y el HMA se permitía la presencia de espacio poroso para drenar y permitir el flujo de aire en el sistema.

4.2 Conclusiones y recomendaciones generales

El desarrollo de la planta hospedera se afectó principalmente por el tipo de sustrato y sus tamaños de partícula independientemente del tratamiento de inoculación empleado.

La temperatura elevada afectó negativamente la formación de esporas, por lo que se sugiere establecer la producción de esporas entre los meses de agosto a diciembre.

El sustrato Tur:A:V a granel y Bg:P:T 1-2 mm, son sustratos ideales para la colonización en raíces de lechuga y formación de esporas de *Gi. gigantea* bajo temperaturas de entre 12 y 21 °C.

Los sustratos Bf:T, Bf:P, Bg:T y Bg:P con granulometría de 0.6-1 mm, estimulan la colonización de *Gi. gigantea* de manera similar que Bg:P:T 1-2 mm y Tur:A:V a granel, lo que sugeriría que también pudieran ser sustratos adecuados para *F. mosseae* y colonizar raíces de plántulas de lechuga a temperaturas de entre 12 y 21 °C.

Es necesario en Tur:A:V a granel analizar cuál sería el tamaño de partícula que propiciara mayor porcentaje de colonización en raíces de lechuga y mayor número de esporas tanto de *Gi. gigantea* como de *F. mosseae*, y con estudios

micromorfológicos estudiar cómo sería la interacción planta-HMA-sustrato, para que esto fuera posible.

Es preciso determinar papel que desempeñen los sustratos probados, en el desarrollo de otras plantas de ciclo de vida corto, tanto para evaluar su desarrollo como para analizar la interacción planta-HMA-sustrato-ambiente, que propicie el establecimiento de la simbiosis y la producción de inoculante.

4.3 Bibliografía

- Bosa, N., E.O. Calvete., V.A.Klein y M.Zuzin. 2003. Crescimento de mudas de gipsofila em diferentes sustratos. Hort. Bras. 21: 514-519.
- Drew, E. A., R. S. Murray y S. E. Smith. 2003: Beyond the rhizosphere: growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands of varying pore sizes. Plant Soil. 251: 105-114.
- Gaur, A. y A. Andholeya. 2000. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. Mycorrhiza 10: 43-48.
- Haugen, L.M. y S.E. Smith. 1992. The effect of high temperature and fallow period on infection of mung bean and cashew roots by the vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Plant Soil, 145: 71–80.
- Landis, T. D. 1990. Containers: Types and Functions. In Landis, T.D., R. W. Tinus., S.E. McDonald., J.P.Barnett. The Container Tree Nursery Manual, Volume 2. Agric. Handbk. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. p 674.
- Ridgway, H.J., J. Kandula y A. Stewart. 2006. Optimising the medium for producing arbuscular mycorrhizal spores and the effect of inoculation on grapevine growth. N. Z. Plant Prot. 59:338-342.
- Saif, S.R. 1981. The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular arbuscular mycorrhizas. I. Effect of soil oxygen on the growth and mineral uptake of *Eupatorium odoratum* L. Inoculated with *Glomus macrocarpus*. New Phitol. 88: 649-659.
- Zanetti, M., C. Fernandes., J.O. Cazetta, J.E. Corá y J.D. Mattos. 2003. Características físicas de sustratos para a produção de mudas cítricas sob telado. Laranja, Cordeiropolis. 24: 519-530.

Anexos

Anexo 2.1 Análisis de la varianza del diseño completamente al azar ($\alpha \leq 0.05$) de las variables de respuesta de las plántulas de lechuga en los tratamientos de inoculación en los sustratos probados.

Variables de respuesta	Tratamiento	Varianza	R^2	C.V	F calculada	Pr>F (α real)	Signifi- cancia
% de colonización.	<i>Gi. gigantea</i>	111.40	0.7973	33.9749	8.59	0.001	**
Número de. esporas	<i>Gi. gigantea</i>	0.6627	0.9856	29.4094	149.5	0.001	**
Volumen radical	NI	4.8819	0.7385	36.4038	6.16	0.001	**
	<i>Gi. gigantea</i>	3.25	0.8425	30.9447	11.68	0.001	**
Peso seco de la. raíz	NI	0.0481	0.7059	35.5265	5.24	0.001	**
	<i>Gi. gigantea</i>	0.0386	0.8211	38.5861	10.02	0.001	**
Peo seco de la. Parte aérea.	NI	0.1510	0.8672	28.4195	14.25	0.001	**
	<i>Gi. gigantea</i>	0.1507	0.8536	36.9536	12.72	0.001	**

NI= No inoculado. *Gi. gigantea*= *Gigaspora gigantea*. R^2 = Coeficiente de correlación cuadrática, C.V = Coeficiente de Variación. ** = Diferencia estadística altamente significativa.

Anexo 2.2 Prueba de T ($\alpha \leq 0.05$) del volumen radical de plántulas de lechuga

Tamaño Partícula	Sustrato	Tratamientos de inoculación micorrízica			DMS	Significancia Prueba de T
		No inoculado	<i>Gi. gigantea</i>	Diferencia		
< 0.6 mm	Bf:T	7.00	10.00	3.00	2.2670	**
	Bg:T	9.66	9.00	0.66	5.8533	NS
	Bf:P	12.33	10.66	1.67	5.4752	NS
	Bg:P	5.16	2.66	2.50	6.9719	NS
0.6-1 mm	Bf:T	5.00	4.66	0.34	0.9255	NS
	Bg:T	8.33	9.66	1.33	6.5441	NS
	Bf:P	7.66	7.33	0.33	1.3088	NS
	Bg:P	6.33	5.83	0.50	8.4696	NS
1-2 mm	Bf:T	1.33	0.50	0.83	0.9255	NS
	Bf:P	2.66	0.66	2.00	1.0347	**
	Bg:P:T	4.66	5.33	0.67	1.3088	NS
A granel	Tur:A:V	2.66	3.66	1.00	3.4628	NS

Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$ DMS: Diferencia Mínima Significativa. **Diferencia estadística altamente significativa. NS= Diferencia estadística no significativa.

Anexo 2.3. Prueba de T ($\alpha \leq 0.05$) del peso seco de la raíz de plántulas de lechuga

Tamaño Partícula	Sustrato	Tratamientos de inoculación micorrízica			DMS	Significancia Prueba de T
		No inoculado	<i>Gi. gigantea</i>	Diferencia		
< 0.6 mm	Bf:T	0.85	0.84	0.01	0.3773	NS
	Bg:T	0.75	0.77	0.02	0.7999	NS
	Bf:P	1.24	1.19	0.05	0.2722	NS
	Bg:P	0.54	0.13	0.41	0.788	NS
0.6-1 mm	Bf:T	0.59	0.31	0.28	0.1587	**
	Bg:T	0.67	0.80	0.13	0.3935	NS
	Bf:P	0.84	0.69	0.15	0.4257	NS
	Bg:P	0.56	0.44	0.11	0.6754	NS
1-2 mm	Bf:T	0.19	0.04	0.15	0.0507	**
	Bf:P	0.29	0.05	0.24	0.2674	NS
	Bg:P:T	0.59	0.52	0.07	0.2848	NS
A granel	Tur:A:V	0.28	0.31	0.03	0.4639	NS

Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$ DMS: Diferencia Mínima Significativa. **Diferencia estadística altamente significativa. NS= Diferencia estadística no significativa.

Anexo 2.4. Prueba de T ($\alpha=0.05$) del peso seco parte aérea de las plántulas de lechuga

Tamaño Partícula	Sustrato	Tratamientos de inoculación micorrízica				Significancia Prueba de T
		No inoculado	<i>Gi. gigantea</i>	Diferencia	DMS	
< 0.6 mm	Bf:T	2.32	2.04	0.28	0.7789	NS
	Bg:T	2.55	1.87	0.68	1.9105	NS
	Bf:P	2.81	2.51	0.30	0.3019	NS
	Bg:P	1.57	0.34	1.23	1.6667	NS
0.6-1 mm	Bf:T	0.94	0.48	0.46	0.2637	**
	Bg:T	1.08	1.57	0.49	0.6052	NS
	Bf:P	1.68	0.88	0.80	0.2957	**
	Bg:P	1.03	0.89	0.14	0.8296	NS
1-2 mm	Bf:T	0.09	0.11	0.02	0.1825	NS
	Bf:P	0.33	0.02	0.31	0.1338	**
	Bg:P:T	1.03	0.69	0.34	0.3288	**
A granel	Tur:A:V	0.94	1.15	0.21	0.8989	NS

Nivel de significancia $\alpha \leq 0.05$ DMS: Diferencia Mínima Significativa. * Diferencia estadística altamente significativa. NS= Diferencia estadística no significativa.

Anexo 2.5. Análisis de la varianza del diseño completamente al azar ($\alpha \leq 0.05$) de las propiedades físicas y químicas de los sustratos probados

Propiedad	DMS	Varianza	R ²	C.V	F calculada	Pr>F (α real)	Significancia
pH	0.7848	0.07	0.74	4.23	6.49	0.001	**
CE	73.455	622.55	0.66	18.20	4.23	0.001	**
Da.	0.0422	0.0002	0.98	3.64	207.10	0.001	**
Dr.	0.3536	0.0144	0.9343	5.2978	31.03	0.001	**
EPT	3.4145	1.3452	0.9477	1.4102	39.59	0.001	**

**= Diferencia estadística altamente significativa. R²=Coeficiente de correlación cuadrática. C.V= Coeficiente de variación. DMS =Diferencia mínima significativa. CE= Conductividad eléctrica. Da.= densidad aparente. Dr.= densidad real. EPT= espacio poroso total.

Anexo 3.1 Análisis de la Varianza del Diseño Completamente al Azar ($\alpha \leq 0.05$) de las variables de respuesta evaluadas en los tratamientos de inoculación de los sustratos Bg:P:T y Tur:A:V con granulometría de 1-2 mm.

Variable de respuesta	Varianza	R ²	C.V	F calculada	Pr>F (α real)	Significancia
porcentaje de colonización	26.7022	0.9348	23.4731	68.83	0.0001	**
Actividad fúngica micorrízica	156.0619	0.4096	136.4269	3.33	0.02	NS
Número de esporas	54.8333	0.184	411.3863	1.08	0.395	NS
Volumen radical	2.22	0.8658	23.2657	30.97	0.0001	**
Peso seco raíz	0.0884	0.765	51.522	15.63	0.0001	**
Peso seco parte aérea	0.143	0.2782	37.8988	2.78	0.0321	*

R²= Coeficiente de correlación cuadrática, C.V = Coeficiente de Variación. ** = Diferencia estadística altamente significativa. NS= Diferencia estadística no significativa.