



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

INTERACCIÓN DE UNA PLANTA CON POTENCIAL ALELOPÁTICO (*Ipomoea purpurea* (L.) Roth) CON FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) y SOYA (*Glycine max* (L.) Merr.) INOCULADAS CON BACTERIAS SIMBIÓTICAS

PAULINA JANNETH PEREZ PERALTA

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



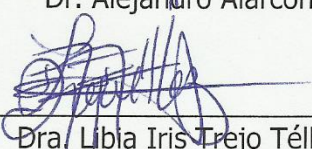
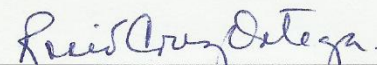
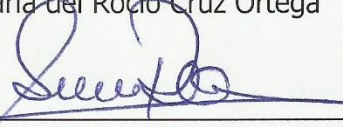
MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
2017

La presente tesis titulada: **INTERACCIÓN DE UNA PLANTA CON POTENCIAL ALELOPÁTICO (*Ipomoea purpurea* (L.) Roth) CON FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Y SOYA (*Glycine max* (L.) Merr.) INOCULADAS CON BACTERIAS SIMBIÓTICAS** realizada por la alumna: **Paulina Janneth Perez Peralta** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO(A)	
	Dr. Ronald Ferrera Cerrato
ASESOR (A)	
	Dr. Alejandro Alarcón
ASESOR (A)	
	Dra. Libia Iris Trejo Téllez
ASESOR (A)	
	Dra. María del Rocío Cruz Ortega
ASESOR (A)	
	Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2017

INTERACCIÓN DE UNA PLANTA CON POTENCIAL ALELOPÁTICO (*Ipomoea purpurea* (L.) Roth) CON FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) Y SOYA (*Glycine max* (L.) Merr.) INOCULADAS CON BACTERIAS SIMBIÓTICAS

Paulina Janneth Perez Peralta, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

La alelopatía es un fenómeno que involucra la producción de metabolitos secundarios que influyen en el crecimiento vegetal y otros organismos, pero este potencial alelopático ha sido poco estudiado en la simbiosis rizobio-leguminosa. Esta investigación tuvo como objetivos: (i) evaluar el potencial alelopático de los lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth en la germinación de semillas y en la longitud radical de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* (L.) Merr.); (ii) determinar su efecto en el crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Bradyrhizobium japonicum* USDA110; (iii) evaluar el potencial alelopático de *I. purpurea* en el crecimiento, fisiología y nodulación de frijol y soya en simbiosis con *R. tropici* y *B. japonicum*, respectivamente; y (iv) determinar la concentración y acumulación de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) en frijol y soya por efecto de la incorporación de *Ipomoea*. Los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea de *Ipomoea* estimularon la germinación y longitud radical de frijol, pero en soya el efecto fue inhibitorio. Así mismo, inhibieron el crecimiento *in vitro* de *R. tropici*, no así en *B. japonicum*. La inoculación con *R. tropici* disminuyó los efectos negativos de *Ipomoea* en el crecimiento y fisiología de frijol; pero reduciendo su actividad nodular. En contraste, la incorporación de *Ipomoea* en plantas de soya favoreció su crecimiento y nodulación. En general, el estado nutrimental de ambas leguminosas, fue afectado por la incorporación de *Ipomoea*; sin embargo, la interacción de ésta planta y la inoculación del rizobio mejoraron el contenido de N, P y K en la raíz de frijol, mientras que en soya, se obtuvo mayor contenido de P y K de la parte aérea. Es importante llevar a cabo más estudios que permitan mayor conocimiento de los efectos de plantas con potencial alelopático en la simbiosis leguminosa- rizobios.

Palabras clave: alelopatía, *Ipomoea purpurea*, simbiosis rizobio-leguminosa, lixiviado acuoso, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*.

INTERACTION OF A PLANT WITH ALELOPATHIC POTENTIAL (*Ipomoea purpurea* (L.) Roth) ON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) AND SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merr.) INOCULATED BY SYMBIOTIC BACTERIA


Paulina Janneth Perez Peralta, MSc.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Allelopathy is a natural phenomenon related to the release of secondary metabolites, which may influence plant growth and other organisms; but this allelopathy has been scarcely studied for the rhizobia-legume symbiosis. Aims of this research were: (i) To evaluate the potential allelopathic effects of aqueous extracts of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth on seed germination and on root length of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean seedlings (*Glycine max* (L.) Merr.); (ii) To determine their effects on the growth of either *Rhizobium tropici* CIAT899 or *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 at *in vitro* cultures; (iii) To evaluate the allelopathic effects of *I. purpurea* on growth, physiology and root nodulation of bean and soybean plants inoculated with *R. tropici* or *B. japonicum*, respectively; and (iv) To determine the content of nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K) in bean and soybean plants due to *Ipomoea*. Aqueous extracts from roots or shoots of *Ipomoea* stimulated seed germination and root length of bean seedlings; however, in soybean these extracts had inhibitory effects. Aqueous extracts also inhibited the growth of *R. tropici*, but not for *B. japonicum*. Inoculating *R. tropici* reduced the negative effects of *Ipomoea* on growth and physiological responses of bean plants, but affecting the nodule activity; in contrast, growth and nodulation of soybean plants were stimulated by *Ipomoea*. Overall, the nutritional status in both legumes was influenced due to *Ipomoea*; this plant in combination with rhizobia improved the content of N, P and K in bean roots, while the content of P and K was enhanced in soybean shoots. Further studies are needed for gaining fundamental knowledge about the effects of allelopathic plants on the legume-rhizobia symbiosis.

Keywords: allelopathy, *Ipomoea purpurea*, legumes, rhizobial, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*.

A decorative illustration of a vine with leaves and a heart-shaped fruit hanging from it, framing the text.

DEDICATORIAS

*A mis padres Teresa Peralta Cruz y J. Jesús Pérez Rodríguez,
quienes me han brindado todo el amor y han sido los pilares
de mi desarrollo.*

*A mis hermanos Oscar, Adriana y Cristian;
así como, a mis sobrinos Oscar, Yoselin, Jair,
Yajahira y Daniel, por todo el cariño
y apoyo incondicional.*

A Rosario, Claudia, Natali y Luz por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a la vida, al cosmos, por no equivocarse y hacer de mí la persona que hoy soy.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, por acogerme en sus instalaciones y por toda la enseñanza profesional y personal brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante mi estancia en la maestría.

A la Unidad de Cámaras de Ambiente Controlado a cargo del Departamento de Campos Experimentales, así como a don Álvaro por la facilitación de la cámara de ambiente controlado y apoyo técnico.

Al laboratorio de Nutrición vegetal por la realización del análisis nutrimental y a la Dra. Libia I. Trejo Téllez por la asesoría y disposición en resolver mis dudas, con todo mi respeto y admiración.

A la Mtra. Cecilia García y al Dr. Crescenciano Saucedo Veloz, por la asesoría en el uso del cromatógrafo de gases para la determinación de la actividad nitrogenasa.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, por aceptarme en su equipo de trabajo, por su orientación, enseñanza, confianza, cariño y ser un ejemplo de liderazgo.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por su exigencia, confianza, paciencia y cariño.

A la Dra. Ma. Del Rocío Cruz Ortega por su contribución y observaciones al presente trabajo, así como por su calidez humana.

A mis asesores Dra. Libia I. Trejo Téllez, Dra. Ma. Del Rocío Cruz Ortega, Dra. Hilda Silva Rojas y Dr. Alejandro Alarcón por sus aportaciones y tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

A todos los profesores del área de Microbiología, en especial al Dr. Juan J. Almaraz, por la confianza, enseñanza y asesoría.

A la Sra. Chayito Galicia, Sr. Manuel Solano, Gabriel y Marco por su amistad y apoyo técnico.

Al Dr. Carlos Trejo López, por su empatía, confianza y aprecio.

A mis amigas de antaño Rosario, Claudia, Natali y Luz, por refrendar nuestra amistad. Así como a Luisa y Nathalie, por mantener el lazo amistoso a pesar de la distancia.

A todos los amigos y compañeros del CP y Microbiología: Araceli, Karina, Luisa Hdz., Paco, Susana, Chema, Abraham, Alicia, Faustino, Santos, Mariana T., Poncho, Jhonatan, Erik, José Luis, Mario, Tere, Gabriel, entre otros (disculpen la omisión), por la amistad y convivencia, sin olvidar a Deisy quien siempre me ayudó amablemente con algunas dudas en laboratorio.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Alelopatía	4
2.2 Liberación y cambios ambientales causados por compuestos alelopáticos	5
2.2.1 Efectos alelopáticos en la biodiversidad vegetal	6
2.2.2 Efectos en el ciclo de nutrientes en el suelo	9
2.2.3 Efectos en los procesos fisiológicos de las especies receptoras	11
2.2.4 Efectos en las comunidades microbianas.....	13
2.3 Alelopatía en los agroecosistemas.....	15
2.3.1 Selección de la planta alelopática	17
2.4 Alelopatía en la rizósfera.....	18
2.5 Simbiosis Rizobio-Leguminosa	21
2.5.1 Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.....	22
2.5.2 Plantas leguminosas utilizadas en esta investigación	24
2.6 Discusión general de la revisión de la literatura	25
III. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo general.....	27
3.2 Objetivos particulares	27
IV. HIPÓTESIS.....	28
4.1 Hipótesis general.....	28
4.2 Hipótesis particulares.....	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS	29
FASE I. Bioensayo con el lixiviado acuoso de <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth.	29
5.1 Material vegetal	29
5.2 Preparación de lixiviados acuosos de <i>Ipomoea purpurea</i>	29

5.3 Germinación de las semillas de frijol y soya	30
5.4 Diseño experimental y análisis estadístico	31
FASE II Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Bradyrhizobium japonicum</i> expuestas al lixiviado acuoso de <i>Ipomoea purpurea</i>	31
5.5. Diseño experimental y análisis estadístico	32
FASE III. Crecimiento y respuesta fisiológica de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) y soya (<i>Glycine max</i>) inoculadas con rizobios y su interacción con <i>Ipomoea purpurea</i>	33
5.6 Ubicación y condiciones experimentales.....	33
5.7 Material vegetal	33
5.8 Diseño experimental y tratamientos	33
5.9 Instalación del experimento	34
5.10 Activación y elaboración de los inóculos de <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum</i>	35
5.11 Variables de estudio.....	36
5.11.1 Variables de crecimiento	36
5.11.2 Variables fisiológicas	36
5.12 Determinación de actividad nitrogenasa (EC 1.18.6.1).....	37
FASE IV. Concentración y acumulación nutrimental en vastagos y raíces de plantas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) y soya (<i>Glycine max</i>) inoculadas con rizobios y su interacción con <i>Ipomoea purpurea</i>	38
VI. RESULTADOS	39
FASE I. Bioensayo con el lixiviado acuoso de <i>Ipomoea purpurea</i> en la germinación y longitud radical de frijol y soya.....	39
6.1.1 Efecto de los lixiviados de <i>Ipomoea purpurea</i> en la germinación de semillas y emergencia de plántulas de frijol.	39
6.2 Efecto de los lixiviados de <i>Ipomoea purpurea</i> en la germinación de semillas y emergencia de plántulas de soya.....	41
FASE II. Efecto de lixiviados acuosos de <i>Ipomoea purpurea</i> en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 y <i>B. japonicum</i> USDA110.....	44

FASE III. Crecimiento y respuesta fisiológica de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y soya (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) inoculadas con rizobios, en presencia de <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth	45
6.3 Efectos en frijol.....	45
6.4 Efectos en soya	49
FASE IV. Concentración y acumulación nutrimental (NPK) de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) y soya (<i>Glycine max</i>) inoculadas con rizobios, en presencia de <i>Ipomoea purpurea</i>	53
6.5 Concentración nutrimental en la parte aérea de frijol y soya	53
6.6 Concentración nutrimental en la raíz de frijol y soya.....	57
6.7 Acumulación nutrimental en la parte aérea de frijol y soya	60
6.8 Acumulación nutrimental en la raíz de frijol y soya.....	64
VII. DISCUSIÓN.....	70
FASE I. Bioensayo con los lixiviados acuosos de <i>Ipomoea purpurea</i> en la germinación y longitud radical de frijol y soya.....	70
FASE II. Efecto de los lixiviados acuosos de <i>Ipomoea purpurea</i> en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 y <i>B. japonicum</i> USDA110.....	71
FASE III. Crecimiento y respuesta fisiológica de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) y soya (<i>Glycine max</i> L. Merr.) inoculadas con rizobios en presencia de <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth	72
FASE IV. Concentración y acumulación nutrimental (NPK) de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) y soya (<i>Glycine max</i>) inoculadas con rizobios, en presencia de <i>Ipomoea purpurea</i>	77
VIII. CONCLUSIONES.....	80
IX. CONSIDERACIONES GENERALES.....	83
X. LITERATURA CITADA.....	85
XI. APÉNDICE.....	97

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de compuestos alelopáticos que intervienen en el proceso de invasión en diferentes especies receptoras (Tomado y modificado de Lorenzo y González, 2010).....	9
---	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posibles vías de liberación de aleloquímicos de origen vegetal al ambiente.....	5
Figura 2. <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth.....	17
Figura 3. Proceso de infección y formación del hilo de infección por los rizobios en los pelos radicales de las leguminosas.	24
Figura 4. Proceso de obtención y filtrado de los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea de <i>Ipomoea purpurea</i> L. Roth.....	30
Figura 5. Germinación de semillas de frijol y soya frente a los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea de <i>Ipomoea purpurea</i> L. Roth.	31
Figura 6. Siembra <i>in vitro</i> de <i>R. tropici</i> y <i>B. japonicum</i> frente a los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea de <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth.....	32
Figura 7. Establecimiento de frijol y soya en presencia de <i>Ipomoea</i> de un mes de crecimiento e inoculación bacteriana.	35
Figura 8. Porcentaje de germinación de las semillas de frijol expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de parte aérea (B) de <i>Ipomoea purpurea</i> a las 24 y 48 h	40

Figura 9. Longitud radical (mm) de las plántulas de frijol expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de la parte aérea (B) de <i>Ipomoea purpurea</i> a las 24 y 48 h.	41
Figura 10. Porcentaje de germinación de las semillas de soya expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de parte aérea (B) de <i>Ipomoea purpurea</i> a las 24 y 48 h.	42
Figura 11. Longitud radical de las plántulas de soya expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de la parte aérea (B) de <i>Ipomoea</i> a las 24 y 48 h.....	43
Figura 12. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rhizobium tropici</i> en presencia de los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea de <i>Ipomoea purpurea</i> aplicados en las concentraciones de 4, 8 y 15%, después de 72 h de cultivo.....	44
Figura 13. Respuesta de crecimiento de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. inoculado con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, en presencia de <i>Ipomoea purpurea</i> L. Roth, después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado.....	46
Figura 14. Efecto en las variables fisiológicas relacionadas con el contenido de clorofila total, intercambio gaseoso y eficiencia cuántica del PSII en plantas de frijol, inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899, en presencia de <i>Ipomoea purpurea</i> , después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado.....	47
Figura 15. Número de nódulos (A), peso seco nodular (B) y cantidad de etileno reducido por acción de la enzima nitrogenasa (C) de plantas de frijol inoculadas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado..	48
Figura 16. Respuesta de crecimiento de soya inoculada con <i>B. japonicum</i> USDA110, en presencia de <i>Ipomoea purpurea</i> L. Roth, después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado	50

- Figura 17.** Efecto en las variables fisiológicas relacionadas con la concentración de clorofila total, intercambio gaseoso y eficiencia cuántica del PSII en plantas de soya, inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, en presencia de *Ipomoea purpurea*, después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado 51
- Figura 18.** Número de nódulos (A), peso seco nodular (B) y cantidad de etileno reducido por acción de la enzima nitrogenasa (C) de plantas de soya inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 después de 35 días de crecimiento 52
- Figura 19.** Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de N en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. 54
- Figura 20.** Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de P en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. 55
- Figura 21.** Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de K en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. 56
- Figura 22.** Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de N en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. 58
- Figura 23.** Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de P en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente 59

Figura 24. Efectos principales de <i>Rhizobium tropici</i> (A), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (D), de <i>Ipomoea purpurea</i> (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de K en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente	61
Figura 25. Efectos principales de <i>Rhizobium tropici</i> (A), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (D), de <i>Ipomoea purpurea</i> (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de N en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente	62
Figura 26. Efectos principales de <i>Rhizobium tropici</i> (A), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (D), de <i>Ipomoea purpurea</i> (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de P en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente	63
Figura 27. Efectos principales de <i>Rhizobium tropici</i> (A), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (D), de <i>Ipomoea purpurea</i> (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de K en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente	65
Figura 28. Efectos principales de <i>Rhizobium tropici</i> (A), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (D), de <i>Ipomoea purpurea</i> (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de N en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente	66
Figura 29. Efectos principales de <i>Rhizobium tropici</i> (A), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (D), de <i>Ipomoea purpurea</i> (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de P en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente	67
Figura 30. Efectos principales de <i>Rhizobium tropici</i> (A), <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (D), de <i>Ipomoea purpurea</i> (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de K en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente.	69

I. INTRODUCCIÓN

La alelopatía es un fenómeno biológico característico de algunas plantas, algas, bacterias, corales y hongos, mediante el cual se producen y se liberan al medio sustancias bioquímicas que influyen en el crecimiento y el desarrollo de otros organismos (Narwal, 2010). La alelopatía funciona como una interferencia química en la cual la planta u organismo productor libera compuestos químicos que ejercen un efecto en otras plantas asociadas y organismos. Estos fitoquímicos, son metabolitos secundarios (MS) que no tienen una función directa en el crecimiento de las plantas, sin embargo, funcionan como aleloquímicos al estar involucrados en el sistema de defensa de la planta en su interacción con el ambiente (Ambika, 2013).

La fuente de aleloquímicos en las plantas es diversa, a partir de hojas, tallos, semillas y flores, entre otros (Albuquerque *et al.*, 2011; Koocheki, *et al.*, 2013) y su liberación se realiza mediante la lixiviación de las partes aéreas de la planta, volatilización a través de las hojas, descomposición de la materia orgánica por los microorganismos y la exudación radical (Anaya, 2003; Bertin *et al.*, 2003; Jilani *et al.*, 2008).

Los aleloquímicos logran influir en diferentes maneras, por ejemplo en el establecimiento de las comunidades vegetales a través de los efectos que ejercen en la diversidad vegetal (Gruntman *et al.*, 2015). Afectan el ciclo de los nutrientes, regulando la solubilización, movilización, liberación y quelación mineral, tras su liberación en la rizósfera (Jabran *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2007). Influyen en los procesos fisiológicos de las especies receptoras, inhibiendo o estimulando la tasa de germinación y el crecimiento de plántulas (Hussain *et al.*, 2008; Lorenzo *et al.*, 2008). Inhiben la fotosíntesis a través de las

interacciones con los componentes del fotosistema II (PSII) (Weir *et al.*, 2004); y en las comunidades microbianas afectan a los hongos micorrízicos, bacterias fijadoras de nitrógeno y agentes patógenos en el suelo (Weston y Mathesius, 2013).

Por otro lado, las leguminosas representan un grupo muy diverso, que contribuye a la fertilidad del suelo a través de la fijación de nitrógeno, ya que a partir de la simbiosis con rizobios, se ha estimado que puede fijar del 24 al 90% de las necesidades de nitrógeno (N) en la planta (Ferrera-Cerrato, 2007; Wang *et al.*, 2015). A su vez, los rizobios tienen la capacidad de establecer simbiosis con más de 100 plantas leguminosas de importancia agrícola (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Entre ellas destacan el frijol común (*Phaseolus* spp.) y la soya (*Glycine max* (L.) Merr.), las cuales son importantes para la nutrición humana y como fuentes de alimentación animal (Janczarek *et al.*, 2015). En ambos cultivos, la presencia de malezas del género *Ipomoea* spp. ha sido reportada (CONABIO, 2015 a; b).

El género *Ipomoea* es uno de los más abundantes de la familia Convolvaceae, el cual tiene diversas propiedades terapéuticas así como alelopáticas, y en las zonas tropicales de México los agricultores han promovido el crecimiento de la especie *I. tricolor*, entre otras del mismo género para proteger el suelo y controlar el crecimiento de malezas (Anaya *et al.*, 1995).

En *I. purpurea*, se han descubierto síntesis bioquímicas exclusivas como la producción de alcaloides ergolínicos, tales como la ergina, isoergina, ácido lisérgico, ergosina y ergosinina, compuestos tóxicos para el ser humano. No obstante, la presencia de saponinas como la solanina y solanigrina, poseen propiedades repelentes para los insectos (Arias-Ortiz *et al.*, 2011). Arévalo-Barajas (1997) reporta la inhibición significativa de la germinación de esporas de hongo micorrízico arbuscular *Glomus* sp. por efecto de los

lixiviados radicales de *I. purpurea*. Sin embargo, son pocos los estudios relacionados con los efectos en las leguminosas y bacterias simbióticas.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es conocer los efectos que ejerce una planta con potencial alelopático como *I. purpurea* en la germinación, crecimiento, fisiología y absorción nutrimental de frijol y soya inoculadas con rizobios. El presente estudio representa una fuente de conocimiento original y básico para las investigaciones futuras asociadas a los efectos alelopáticos en la simbiosis rizobio-leguminosa, así como lo relacionado con el potencial alelopático de *I. purpurea* y su aplicación en el manejo y control de malezas de manera ecológica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Alelopatía

La alelopatía es un término acuñado inicialmente por Molisch en 1937, que se deriva de la palabra griega "allelon", que significa "recíproco", y "pathos" que es "sufrir", por lo que de forma literal expresa el sufrimiento recíproco entre dos organismos (Zohaib *et al.*, 2016). No obstante, la Sociedad Internacional de Alelopatía, definió en 1996 a la alelopatía como cualquier proceso que implica la síntesis de metabolitos secundarios (MS) producidos por plantas, microorganismos, virus y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de los sistemas biológicos e incluso agrícolas (Torres *et al.*, 1996).

En este fenómeno, un organismo puede producir uno o más MS que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la reproducción de otros organismos. Estos metabolitos secundarios, son compuestos de bajo peso molecular, esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta en su interacción con el ambiente. Los MS pueden ayudar a atraer a polinizadores o dispersores de semillas, como defensa ante enemigos naturales, o bien como aleloquímicos contra competidores potenciales (Kroymann, 2011; Muzell-Trezzi *et al.*, 2016).

Entre los grupos de compuestos relacionados con efectos alelopáticos, destacan los fenoles simples, flavonoides, terpenoides, alcaloides, ácidos grasos, poliacetilenos, compuestos sulfurados, oligopéptidos y glucosinolatos, los cuales también pueden actuar por acción conjunta de varios aleloquímicos (Inderjit y Duke, 2003). Sin embargo, debe considerarse que la actividad biológica de estos compuestos dependerá de su naturaleza

química, concentración, de la sensibilidad de la planta receptora, del proceso metabólico implicado y de las condiciones ambientales (Anaya, 2003; Muzell-Trezzi *et al.*, 2016).

2.2 Liberación y cambios ambientales causados por compuestos alelopáticos

La fuente de aleloquímicos puede proceder de diversas partes de la planta, tales como hojas, tallos, raíces, rizomas, flores, semillas y polen (Albuquerque *et al.*, 2011; Koocheki *et al.*, 2013). La liberación de estos compuestos es variable y ocurre de maneras diversas, las principales son: (a) lixiviación o lavado de las partes aéreas de la planta; (b) volatilización a través de las hojas; (c) liberación de compuestos de restos orgánicos por lixiviación o descomposición microbiana de los mismos (hojarasca o raíces muertas); y (d) exudación a través de las raíces (Anaya, 2003; Bertin *et al.*, 2003; Jilani *et al.*, 2008) (Figura 1).

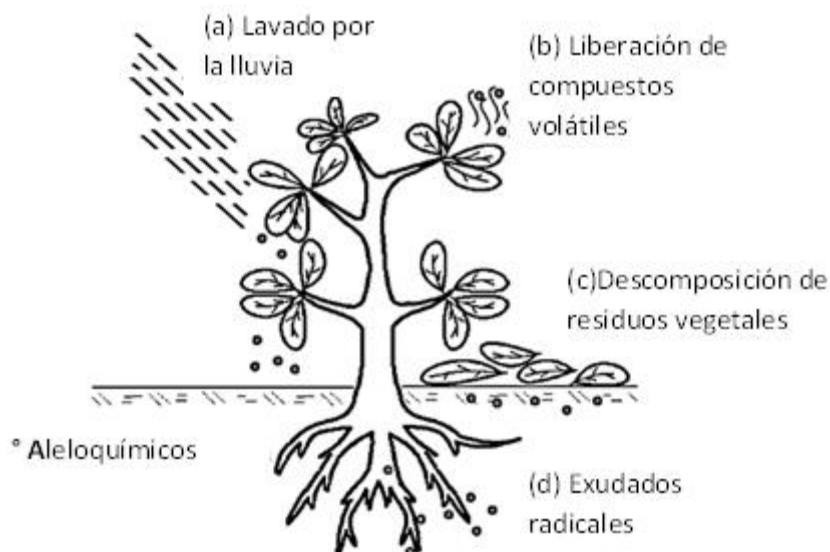


Figura 1. Posibles vías de liberación de aleloquímicos de origen vegetal al ambiente (Tomada y modificada de Albuquerque *et al.*, 2011).

Es importante señalar que los diferentes tipos de estrés biótico y abiótico pueden alterar la producción y la liberación de aleloquímicos durante el ciclo vital de las plantas. Entre los factores ambientales que pueden afectar directa o indirectamente el rendimiento de los MS de la planta, se encuentran la radiación UV, la temperatura, la disponibilidad de agua y nutrientes, la competencia, enfermedades y la herbivoría, afectando la producción de compuestos, su biodisponibilidad y el efecto en la especie receptora (Jilani *et al.*, 2008; Muzel-Trezzi *et al.*, 2016).

De la misma manera, la biodisponibilidad de los aleloquímicos en el suelo se considera dependiente de los procesos de transferencia como la adsorción y la lixiviación, así como de la degradación biótica y/o abiótica (Kobayashi, 2004). Además, el contenido de arcilla y materia orgánica, la disponibilidad del agua, el pH del suelo y la actividad biológica de los microorganismos también influyen en la alelopatía, ya que el potencial alelopático de muchos compuestos no puede ser expresado en algunos suelos, debido a la adsorción química en los coloides; por ejemplo, se ha detectado que la sorgoleona, se une fuertemente a los coloides del suelo debido a su carácter altamente lipofílico (Muzel-Trezzi *et al.*, 2016).

2.2.1 Efectos alelopáticos en la biodiversidad vegetal

Tradicionalmente, la competencia por los recursos (luz, agua, nutrientes, entre otros) define de manera significativa la diversidad y la dinámica de las comunidades; sin embargo, la alelopatía también puede afectar el establecimiento de las comunidades vegetales (Callaway y Ridenour, 2004; Fernández *et al.*, 2016). En este sentido, la alelopatía funciona como un mecanismo de interferencia en el crecimiento y desarrollo de

la planta mediado por la adición de los aleloquímicos a la rizósfera del suelo (Cruz-Ortega *et al.*, 2007).

En la invasión de plantas exóticas, la participación de metabolitos secundarios como aleloquímicos, ha permitido proponer diversas teorías que explican los procesos de invasión en los ecosistemas. La hipótesis de NW (del inglés ‘Novel Weapons’, “nuevas armas”), refiere que las especies alóctonas liberan aleloquímicos que afectan el desarrollo de las plantas nativas (Christina *et al.*, 2015; Hierro y Callaway, 2003). Este éxito supone la falta de adaptación de las especies autóctonas frente a los aleloquímicos de las plantas alóctonas (Gruntman *et al.*, 2015; Inderjit *et al.*, 2006; Svensson *et al.*, 2013). Lo anterior ha sido basado principalmente en los estudios realizados con *Centaurea diffusa* y *C. maculosa*, plantas invasoras poseedoras de compuestos químicos novedosos que ejercen un efecto fitotóxico en especies nativas (Christina *et al.*, 2015; Hierro y Callaway, 2003).

A pesar de que los estudios se han realizado en periodos cortos, éstos indican que el impacto de las plantas invasoras en los ecosistemas es relativamente pequeño, pero la incidencia en la flora autóctona podría ser muy alta. Por ejemplo, Murrel *et al.* (2011) reportan un alto impacto ecológico de *Fallopia x bohemica* en la vegetación nativa, debido al componente alelopático.

En experimentos a pequeña escala, Maron y Marler (2007) reportan la relación entre la diversidad vegetal de la comunidad y la invasión por especies no nativas es negativa, por tanto, la resistencia del sistema a la invasión aumenta con la diversidad de especies, ya que es posible que las comunidades ricas en especies ofrezcan pocos nichos vacantes (efecto de la complementariedad del nicho). Sin embargo, también existen especies de plantas

invasoras que representan una gran amenaza a la biodiversidad y/o abundancia de forma negativa en las comunidades de plantas nativas y los ecosistemas (McGeoch *et al.*, 2010).

Los efectos de los aleloquímicos en campo, son controversiales, ya que no siempre pueden observarse claramente, debido a la influencia que ejercen los factores físicos, químicos y biológicos del suelo (Zhu *et al.*, 2011). Por ejemplo, Bais *et al.* (2003), consideran que los niveles de aleloquímicos en el suelo originalmente reportados son irreproducibles, un ejemplo es la catequina, cuya concentración disminuye en el suelo debido a la degradación química, a su unión con las arcillas, a la degradación microbiana o a la combinación estos factores (Zhu *et al.*, 2011). Diversos estudios reportan algunos efectos que generan las plantas alelopáticas en diversas especies receptoras de compuestos alelopáticos que intervienen en el proceso de invasión (Lorenzo y González, 2010) (Cuadro 1).

En general, las investigaciones se basan únicamente en bioensayos, en donde los extractos obtenidos de especies alóctonas se aplican a especies receptoras, tratando de identificar los compuestos químicos del extracto y determinar cuál es el responsable del efecto alelopático. No obstante, aún existen dudas respecto a la función que tienen los metabolitos secundarios como aleloquímicos capaces de determinar la composición vegetal de un área invadida, donde también participan microorganismos edáficos (Lorenzo y González, 2010; Meiners, 2014; Zhang *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Efecto de compuestos alelopáticos que intervienen en el proceso de invasión en diferentes especies receptoras (Tomado y modificado de Lorenzo y González, 2010).

Compuesto alelopático	Especie invasora	Efecto	Especie receptora
Sesquiterpenos	<i>Chrysanthemoides monilifera</i> spp <i>rotundata</i> (DC.) Norl.	Inhibición del crecimiento de plántulas	<i>Isolepis nodosa</i> (Rottb.) R.Br. <i>Acacia longifolia</i> var. <i>sophorae</i> (Labill.) F. Muell. <i>Banksia integrifolia</i> L. f.
Fenoles solubles	<i>Thypha angustifolia</i> L.	Reducción del crecimiento	<i>Bolboschoenus fluviatilis</i> (Torr.)
Glucosinolatos y productos de hidrólisis	Brassicaceae	Interacciones planta-planta, planta-microorganismo y planta-insecto	Especies nativas del área invadida
Fenoles (7,8-benzoflavona)	<i>Acroptilon repens</i> L. DC.	Efecto negativo en cuatro especies de leguminosas y sus rizósferas	<i>Astragalus cicer</i> L. <i>Hedysarum boreale</i> Nutt. <i>Luinis sericeus</i> H.B.K. <i>Medicago sativa</i> L.
Fenoles (catequina)	<i>Centaurea maculosa</i> Lam.	Efecto negativo en cuatro especies de leguminosas y sus rizósferas	<i>Astragalus cicer</i> L. <i>Hedysarum boreale</i> Nutt. <i>Luinis sericeus</i> H. B. K. <i>Medicago sativa</i> L.

2.2.2 Efectos en el ciclo de nutrimentos en el suelo

Los aleloquímicos procedentes de especies invasoras tienen un fuerte impacto en la dinámica del ciclo de nutrientes en el suelo de un área invadida. En general, se considera que la concentración de carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) total incrementa con la abundancia de especies invasoras (Li *et al.*, 2007). Estudios realizados con plantas invasoras fijadoras de nitrógeno indican un elevado contenido en N y una relación C/N más

baja que en las áreas no invadidas. Estas variaciones junto con un aumento en los contenidos de C orgánico, N total y cationes intercambiables también implican cambios en los microorganismos del suelo.

Otros trabajos reportan resultados diferentes en las áreas invadidas, pues determinaron que disminuye el N y P total, el N (NO_3^-) y P disponible, así como la estabilidad de los agregados, mientras que el C orgánico y el N (NH_4^+) incrementan (Zhang *et al.*, 2009). Por el contrario, los procesos de invasión también pueden inhibir la capacidad de absorción de los nutrientes de las plantas nativas, por ejemplo, a través de la supresión de micorrizas asociadas (Callaway *et al.*, 2008; Rout y Callaway, 2009).

Los aleloquímicos regulan la solubilización, movilización, liberación y quelación mineral, cuando son liberados en la rizósfera (Jabran *et al.*, 2013). Entre las modificaciones del suelo causadas por aleloquímicos, están relacionadas con los monómeros fenólicos y ácidos fenólicos, puesto que pueden formar complejos con los nutrientes y con sustancias tóxicas en el suelo, afectando su disponibilidad para las plantas. Los compuestos fenólicos pueden incrementar la disponibilidad de fósforo para las plantas al competir con los sitios de inmovilización de este nutriente en la materia orgánica del suelo, las partículas de arcilla, aluminio soluble, hierro o manganeso (Appel, 1993). Además, aleloquímicos como la sorgoleona, producida y liberada por las raíces de las plantas de sorgo, pueden influir en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, como el nitrógeno, al inhibir ésta, la actividad nitrificante de las bacterias *Nitrosomonas* (Muze-Trezzi *et al.*, 2016; Tesfamariam *et al.*, 2014).

2.2.3 Efectos en los procesos fisiológicos de las especies receptoras

Entre los efectos producidos por los compuestos alelopáticos se encuentran aquellos producidos en los procesos fisiológicos de la planta receptora como la inhibición y estimulación de la tasa de germinación o en el crecimiento de plántulas (Hussain *et al.*, 2008; Lorenzo *et al.*, 2008). Por ejemplo, la catequina (-) presente en *Centaurea maculosa*, inhibe la germinación de las semillas de especies de plantas que se consideran tolerantes a sus efectos fitotóxicos, así como la germinación de sus propias semillas, por lo que se ha sugerido el uso de esta especie incluso para regular su propia población y evitar la competencia por recursos que pueden estar limitados (Weir *et al.*, 2003). La inhibición en la germinación de las semillas de *C. maculosa* se atribuye a la interrupción de la actividad glucolítica (la respiración mitocondrial), que proporciona al embrión de la semilla el poder reductor, ATP y los productos de carbono necesarios para la biosíntesis de las raíces y partes aéreas de la planta (Weir *et al.*, 2004).

También se ha reportado que los aleloquímicos inhiben la fotosíntesis a través de las interacciones con los componentes del fotosistema II (PSII). El PSII es un complejo multiproteico que cataliza una serie de reacciones de transferencia de electrones que resulta en la disociación del agua y lleva a cabo la reducción de la plastoquinona para transformar la luz solar en energía química (Caffarri *et al.*, 2009; Hankamer y Barber, 1997). En este sentido, ha sido bien caracterizado el papel de la sorgoleona como un inhibidor de la cadena transportadora de electrones en el cloroplasto, una actividad similar a la realizada por herbicidas como la atrazina. Asimismo, la sorgoleona inhibe la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), lo que interrumpe la biosíntesis de carotenoides y provoca la destrucción de la clorofila (Czarnota *et al.*, 2001; Meazza *et al.*, 2002; Weir *et al.*, 2004).

Por su parte, las transformaciones redox que resultan en la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) desempeñan un papel importante en las interacciones entre las plantas y microorganismos patógenos, mutualistas y competidores; además de ser relacionadas en procesos de la planta como el crecimiento, el ciclo celular, actividad estomática, entre otros (Ambika, 2013).

La toxicidad de muchas quinonas y fenoles puede ser atribuida a la formación de radicales semiquinona que donan electrones al oxígeno molecular, formando aniones superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Estos aniones pueden someterse a una serie de reacciones adicionales para convertirse en radicales hidroxilo (OH \cdot) o hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), los que pueden afectar la permeabilidad de la membrana y causar daño a las proteínas y al ADN. Algunos aleloquímicos rápidamente despolarizan la membrana celular, incrementan la permeabilidad, generan moléculas señales para la peroxidación lipídica y conducen a la muerte celular (Huckelhoven y Kogel, 2003; Weir *et al.*, 2004). Por ejemplo, los exudados radicales del pepino generan un efecto autotóxico que reduce la conductancia estomática, la transpiración foliar y la fotosíntesis, así como un aumento en la actividad enzimática de la peroxidasa (POD) y de la superóxido dismutasa (SOD) (Yu *et al.*, 2003; Weir *et al.*, 2004).

Existen otros efectos alelopáticos alternativos que pueden alterar los procesos metabólicos de la planta receptora y que poseen un alto potencial de uso. Por ejemplo, los aleloquímicos tienen el potencial de llevar a cabo funciones similares a las que realizan los herbicidas comerciales como el glifosato y derivados de la sulfonilurea. Sin embargo, la interrupción del metabolismo de aminoácidos por aleloquímicos aún no se ha demostrado en las plantas, que es sin duda, otro mecanismo potencial para aleloquímicos que actúan como análogos de aminoácidos (Nakajima *et al.*, 2001). También, los aleloquímicos pueden

regular la concentración de hormonas como las auxinas y giberelinas. Aunque algunos flavonoides como las agliconas, pueden inhibir el transporte de auxinas, que resulta en la inducción de raíces laterales y la supresión de crecimiento geotrópico (Weir *et al.*, 2004).

2.2.4 Efectos en las comunidades microbianas

Los compuestos alelopáticos de las plantas pueden afectar las asociaciones entre planta-planta, y planta-microorganismos, tal es el caso de los hongos micorrízicos, bacterias fijadoras de nitrógeno y agentes patógenos en el suelo (Weston y Mathesius, 2013). Los aleloquímicos de las plantas pueden afectar el establecimiento de la micorriza arbuscular y de la ectomicorriza, o bien, inhibir la germinación de semillas o el establecimiento de la asociación con plantas vecinas (Cipollini *et al.*, 2012).

En investigaciones relacionadas con hongos micorrízicos, Li *et al.* (2014), efectuaron un experimento con el compuesto artemisinina y sus efectos en tres aislados de hongos de *Suillus luteus* (*S. luteus* 1, *S. luteus* 13, y *S. luteus* 11). Bajo condiciones *in vitro*, mostraron que a mayor concentración de artemisinina, la biomasa de las diferentes especies de *Suillus* disminuyó. De la misma manera, se observó que la artemisinina inhibió la absorción de nutrimentos por los hongos ectomicorrízicos.

Achatz *et al.* (2014) evaluaron el efecto del compuesto juglona a partir del extracto de hojas de *Juglans regia* L. en plantas de jitomate inoculadas con *Rhizophagus irregularis*. Demostraron que la juglona afecta principalmente la producción de biomasa aérea y radical del jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) cuando fue inoculado con *R. irregularis*. Además, el micelio fúngico ha sido considerado una vía de transporte de juglona a través de las hifas extraradicales (Barto *et al.*, 2012).

La asociación entre los microorganismos responsables de la fijación biológica del nitrógeno y las plantas hospederas es estimulada por algunos flavonoides producidos por una leguminosa. Estos flavonoides son responsables de la atracción bacteriana en la rizósfera e incrementan la expresión de genes específicos de nodulación (genes *Nod*) (Bertin *et al.*, 2003). En contraste, las sustancias fenólicas producidas por plantas de arroz mostraron un efecto negativo en las tres cepas de *Rhizobium* spp., como consecuencia, hubo reducción en el contenido de leghemoglobina en los nódulos de dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), afectandose así, la capacidad de fijación de nitrógeno de las plantas (Rice *et al.*, 1981; Muzel-Trezzi *et al.*, 2016).

Los aleloquímicos también pueden tener un impacto en las poblaciones de especies patógenas que son potencialmente perjudiciales para los cultivos. Tal es el caso de los exudados radicales del arroz, con una alta concentración de ácido cumárico, que resulta en una disminución del ataque por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* en un cultivo de rotación de melón (Hao *et al.*, 2010). Asimismo, los aleloquímicos también lograron reducir las poblaciones de varias especies de artrópodos fitófagos (Farooq *et al.*, 2013).

Estudios con especies forestales que establecen simbiosis micorrízica arbuscular y la asociación con hongos septados oscuros (DSE por sus siglas en inglés), muestran la interrupción de estos mutualismos por la presencia de compuestos alelopáticos, generando una reducción severa de la tasa fotosintética, lo que condujo a un estrés de carbono, lo cual interfirió en el crecimiento y la floración (Brouwer *et al.*, 2015; Hale *et al.*, 2011; Zhu *et al.* 2011). En plantas herbáceas perennes, el estrés crónico de carbono puede alterar la supervivencia, la floración y prolongada latencia de semillas (Gremer y Sala, 2013).

En otro sentido, Bais *et al.* (2004) indican un incremento de la biomasa microbiana a medida que incrementa la abundancia de la especie invasora en espacios invadidos. Lorenzo *et al.* (2013), reportan un aumento en la actividad metabólica (respiración basal) y de la diversidad funcional; sin embargo, también se muestra que algunas especies invasoras establecen ciclos de retroalimentación positiva con el suelo que invaden, en los que la rizósfera de la especie alóctona se enriquece de organismos mutualistas que la benefician (Rodríguez-Echeverría, 2009).

2.3 Alelopatía en los agroecosistemas

La capacidad de diversas plantas para inducir efectos alelopáticos en la vegetación que les rodea, ha sido documentada desde tiempos remotos. El registro alelopático más antiguo fue reportado por Teofrasto (300 a. C.), quien detectó el efecto perjudicial de la col (*Brassica* L.) en el crecimiento de la vid (*Vitis* L.) y propuso que estos efectos eran producidos por los “olores” de las plantas de col (Zohaib *et al.*, 2016).

En los sistemas de cultivo orgánicos y convencionales, los cultivos de cobertura no solo ofrecen la reducción de la erosión del suelo o la capacidad de retención de agua, sino también, suprimen eficazmente especies arvenses mediante la liberación de compuestos fitotóxicos que inhiben la emergencia de plántulas de malezas (Ashraf *et al.*, 2017).

Por lo anterior, algunos integrantes de la familia Poaceae, como el centeno (*Secale cereale* L.), ha sido utilizado como abono verde o como cultivo de cobertura debido a su abundante producción de biomasa y la liberación de exudados radicales para suprimir malezas gracias a compuestos como las benzoxazinonas [2,4-dihydroxi-1,4(2H)-

benzoxazina-3-1 (DIBOA) y 2(3H)-benzoxazolinona (BOA)] (Albuquerque *et al.*, 2011; Jabran *et al.*, 2015; Shulz *et al.*, 2013).

Otras gramíneas como el trigo (*Triticum aestivum* L.) tiene potencial alelopático en el manejo de malezas, plagas y enfermedades, debido a la liberación de aleloquímicos que incluyen ácidos fenólicos (p-hidroxibenzoico, vanillico, p-cumárico, y ácidos siríngico y ferúlico), ácidos hidroxámicos y ácidos grasos de cadena corta (Albuquerque *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2001). Otros ejemplos son: el sorgo (*Sorghum bicolor* y *S. sudanense*), la cebada (*Hordeum vulgare* L.), la avena (*Avena strigosa* Schreb. y *A. sativa* L), el arroz (*Oryza sativa* L.) y el girasol (*Helianthus annuus* L.), que como cultivos de cobertura podrían ser útiles en el control de la población de malas hierbas (Ashraf *et al.*, 2017; Muzel-Trezzi *et al.*, 2016).

Otros cultivos con actividad alelopática son *Vicia* spp. y otras especies de la familia Fabaceae, que liberan aleloquímicos e inhiben la emergencia de las malezas. Por ejemplo, la alfalfa (*Medicago sativa* L.) genera sustancias como las saponinas, el ácido clorogénico, medicarpina y otros compuestos fenólicos similares que son solubles en agua y se concentran principalmente en la parte aérea (Albuquerque *et al.*, 2011).

En cuanto a árboles se refiere, el nogal negro (*Juglans nigra* L.) es una de las especies leñosas con alta actividad alelopática ya que el compuesto juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) funciona como un potente aleloquímico que ataca el tejido vascular y provoca la muerte de numerosas plantas como el tomate, papa, pera, manzana, pepino, sandía, la alfalfa, el trigo, cebada y maíz (Bertin *et al.*, 2003).

2.3.1 Selección de la planta alelopática

Dentro del género *Ipomoea* (familia Convulvaceae), *Ipomoea tricolor* Cav. se utiliza para diversos propósitos que incluyen propiedades purgativas, debido a la presencia de resinas glucosídicas en su tejido foliar (Meira *et al.*, 2012); y en las zonas tropicales de México los agricultores promueven el crecimiento de *I. tricolor* y otras especies de este género para proteger el suelo y controlar el crecimiento de malezas (Anaya *et al.*, 1995).

Ipomoea purpurea (L.) Roth. es una planta anual, originaria del continente americano, es conocida como “manto de la virgen”, “campanilla”, “batatilla” y “gloria de la mañana” (CONABIO, 2016b) (Figura 2). Es una enredadera, que rodea la vegetación y gana altura trepando sobre las plantas cultivadas, y que destaca por ser ornamental, melífera, forrajera. También puede incidir en la dinámica de insectos plaga y el desarrollo de enfermedades (Arias-Ortiz *et al.*, 2011). Representa una de las malezas causante de graves problemas principalmente en la agricultura de Brasil, México, Sudáfrica y los Estados Unidos (Defelice, 2001).



Figura 2. *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (CONABIO, 2016b).

En México, es una maleza común y ampliamente distribuida que genera efectos negativos en cultivos de ajonjolí, calabaza, avena, algodón, caña, chile, café, frijol, tomate, mango, entre otros (CONABIO, 2016b). Urzúa-Soria *et al.* (2002) reportan la incidencia de *I. purpurea* en la rotación de cultivo maíz-trigo; en cultivos de pimiento morrón (Schutte y Cunningham 2015), café o algodón (Arias-Ortiz, *et al.*, 2011) y en Argentina se ha registrado en cultivos de soya, en donde su hábito trepador dificulta la cosecha (Daita *et al.*, 2011).

Algunos compuestos reportados en *I. purpurea* son exclusivos, tal como los alcaloides ergolínicos, entre los cuales destacan la ergina, isoergina, ácido lisérgico, ergosina y ergosinina, los cuales son tóxicos para el ser humano. No obstante, también se reportan saponinas como solanina y solanigrina, las cuales poseen propiedades repelentes para los insectos (Arias-Ortiz *et al.*, 2011). Así mismo, los extractos de convolvuláceas pueden ser exitosos en el control de hongos fitopatógenos (Mahmoud *et al.*, 2004).

2.4 Alelopatía en la rizósfera

El concepto de rizósfera ha sido utilizado para describir aquel volumen de suelo que es influenciado por las raíces, es decir, la interfase entre la raíz y el suelo. Es un ambiente altamente complejo y dinámico donde ocurren diversas interacciones entre raíces, minerales, compuestos orgánicos, solutos, gases y microorganismos (hongos, bacterias, protozoarios, nemátodos e invertebrados) (Oburger y Schmidt, 2016).

En la rizósfera, las raíces de las plantas secretan un conjunto de metabolitos primarios como ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos; así como, metabolitos secundarios tales como alcaloides, terpenoides y compuestos fenólicos (Berendsen *et al.*,

2012; Venturi y Keel, 2016). A partir de éstos se pueden generar diversas interacciones, entre las que destaca la comunicación química entre plantas y organismos, interfiriendo en la señalización o afectando el establecimiento de una comunidad biótica. No obstante, dependiendo de la acción fitotóxica, la concentración bioactiva, la persistencia y destino de los metabolitos secundarios en el entorno en que son liberados, pueden actuar como compuestos alelopáticos (Inderjit y Duke, 2003).

Por ejemplo, los compuestos fenólicos, son algunas de las moléculas con más presencia entre los metabolitos secundarios de las plantas, involucrados en diversos procesos que incluyen la resistencia al estrés biótico y abiótico o como pigmentos de flores, entre otros (Joachim, y Ndakidemi. 2007). En el suelo afectan la degradación de la materia orgánica; en la rizósfera, actúan como precursores importantes para la síntesis de sustancias húmicas, por lo que alteran las actividades microbianas, la mineralización y disponibilidad de N (Hattenschwiler y Vitousek, 2000; Kruse *et al.*, 2000).

La presencia y acumulación de compuestos fenólicos en el suelo, también pueden provocar la inhibición de pre-emergencia, germinación o postgerminación de las semillas e intervenir en las funciones de crecimiento vegetal. Por su parte, los compuestos fenólicos como mircetina, quercetina, y miricetina han sido identificados como toxinas para *Rhizobium*, mientras que la quercetina, rutina, catecol, p-cumárico, ácido gentístico, ácido salicílico y ácido vanílico se presentan como inhibidores de simbiosis con rizobios y hongos (Joachim y Ndakidemi, 2007).

La defensa de la planta contra los patógenos, nematodos e insectos fitófagos está basada en la síntesis, liberación y acumulación de diversos compuestos fenólicos. Por ejemplo, altas cantidades de limoneno-10 y limoneno en el aceite esencial de

Dracocephalum kotschy Boiss. (Labiatae), inhibieron la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas de *Amaranthus retroflexus* L. y *Chenopodium album* L.; además, tuvieron alta actividad insecticida contra el pulgón verde del melocotonero, *Myzus persicae* Sulz. (Jalaei *et al.*, 2015).

Los flavonoides son los componentes más esenciales presentes en los exudados de las raíces de las leguminosas y actúan como señales principales de rizobios (Janczarek *et al.*, 2015). Más de 10,000 flavonoides diferentes han sido identificados en las plantas. Los flavonoides que son liberados como agliconas o conjugados glucosídicos, son de los más solubles, por lo que pueden tener mayor potencial de difusión desde la superficie de la raíz. Sin embargo, los flavonoides que son secretados en la rizósfera varían en número y concentración, ya que éstos tienden a aumentar con la presencia de bacterias simbióticas compatibles (Janczarek *et al.*, 2015; Weston y Mathesius, 2013).

En la raíz, los flavonoides se acumulan típicamente en la cofia y en las raíces laterales en altas cantidades, sitios donde se produce la infección en leguminosas por las rizobios (Hassan y Mathesius, 2012). Estos compuestos tienen un papel significativo como quimio atrayentes para especies bacterianas compatibles y señalización en las plantas, así como en la regulación de la expresión de muchos genes incluyendo los genes *Nod* responsables de la nodulación, necesaria para la fijación de nitrógeno (Subramanian *et al.*, 2007).

Simultáneamente, los flavonoides pueden ser inductores o represores para algunas especies de rizobios; por ejemplo, la luteolina y la 7,40-dihidroxi flavona funcionan como inductoras de genes *Nod*, mientras que la genisteína inhibe la expresión de estos genes en *Sinorhizobium meliloti* (Peck *et al.*, 2006). Así también, los flavonoides desempeñan

distintas funciones durante la formación de nódulos; en *Medicago truncatula* el compuesto 7,40-dihydroxiflavona indujo la formación de nódulos indeterminados y la síntesis y liberación de factores Nod en *S. meliloti* (Zhang *et al.*, 2009).

2.5 Simbiosis Rizobio-Leguminosa

El nitrógeno (N) es el nutrimento económicamente más importante, por ser limitante en la mayoría de los cultivos de México y de la mayoría de los suelos de todo el mundo (Núñez-Escobar, 2012). Para solventar esta limitación, algunas plantas terrestres han desarrollado la capacidad de formar asociaciones con microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico (N₂) (Hima *et al.*, 2010).

Los rizobios son un grupo diverso de bacterias de vida libre en el suelo, cuya función ambiental esencial es la de fijar el nitrógeno atmosférico en simbiosis con las leguminosas; estas bacterias son Gram negativas, en forma de bacilo corto, y establecen simbiosis con las raíces de leguminosas. Los rizobios invaden los pelos radicales e inducen la formación de órganos especializados llamados nódulos, en donde el N₂ es reducido a amonio (NH₄⁺) (Masson-Boivin, 2016; Zhang *et al.*, 2000). En esta simbiosis la bacteria recibe además de un nicho, carbohidratos y otros nutrimentos necesarios para multiplicarse (Zhang *et al.*, 2000). Cuando el nódulo envejece, la bacteria es liberada en el suelo, en donde retoma el modo de vida saprobio y compite con otras bacterias para colonizar nuevos hospederos (Masson-Boivin, 2016).

Los rizobios se han clasificado en 14 géneros pertenecientes a la subclase-a (*Rhizobium*, *Sinorhizobium* [*Ensifer*], *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Herbaspirillum*, *Shinela* y

Microvirga) y a la subclase-b (*Burkholderia* y *Cupriavidus*) de Proteobacteria (Dresler-Nurmi *et al.*, 2009; Janczarek *et al.*, 2015).

Cabe resaltar que este grupo de bacterias al reducir el N₂, juega uno de los papeles más importantes en la agricultura, ya que constituyen cerca del 25% de la producción agrícola primaria del mundo (Ferguson *et al.*, 2010; van Hameren *et al.*, 2013). Por su parte, las leguminosas representan un grupo muy diverso morfológicamente, con cerca de 20,000 especies que se encuentran distribuidas en casi todo el planeta, conformado desde herbáceas anuales hasta árboles tropicales, y contribuyen a la fertilidad de los suelos a través de la fijación de nitrógeno.

Los rizobios tienen la capacidad de establecer simbiosis con especies de leguminosas que incluyen más de 100 plantas de importancia agrícola (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Entre ellas, destacan el frijol común (*Phaseolus* spp.), la soya (*Glycine max*) y los guisantes (*Pisum* spp.), los cuales son importantes para la nutrición humana; así como, la alfalfa (*Medicago* spp.), trébol (*Trifolium* spp.) y haba (*Vicia* spp.), que son fuentes de alimentación de los animales (Janczarek *et al.*, 2015).

2.5.1 Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa

Diversos compuestos como flavonoides y betaínas son secretadas por la raíz hospedera, y entre sus funciones está la de activar los genes *Nod*, que a su vez inducen a los factores *Nod* (Miransari, 2014). Los factores *Nod* son importantes dado que inician muchos de los cambios en la planta al iniciarse el proceso de nodulación, así como en la deformación de los pelos radicales. También actúan en la despolarización de la membrana, las oscilaciones de calcio intracelular y la iniciación de la división celular de la corteza de

la raíz, que posteriormente permiten el establecimiento de un meristemo y primordio nodular (Gage, 2004).

En la mayoría de las leguminosas, el establecimiento de la simbiosis inicia cuando los rizobios llegan al tejido de la raíz, donde crecen y se dividen dentro de un túbulo llamado hilo de infección, estructura formada por la invaginación de la membrana plasmática del pelo radical, a través del cual las bacterias penetran a la célula (Oldroyd *et al.*, 2011).

Este proceso inicia cuando los rizobios quedan atrapados entre las paredes de las células de los pelos radicales, degradando la pared celular local y generando formas curvas o rizadas (Gage, 2004; Gibson *et al.*, 2008). Posteriormente, el hilo de infección se extiende y los rizobios forman el primordio nodular, donde se liberan los rizobios con un proceso de endocitosis y se diferencian en formas simbióticas llamadas bacteroides, los cuales reducen el nitrógeno atmosférico a amonio usando el complejo enzimático de la nitrogenasa (Kereszt y Kondorosi, 2011). La formación de nódulos, funciona como un nicho anaeróbico para la fijación de nitrógeno, en donde se protege a la nitrogenasa de ser inactivada por el oxígeno. Posteriormente, el amonio es transportado desde los nódulos a la planta hospedera y, a cambio, la planta suministra a los bacteroides fuentes de carbono en forma de ácidos dicarboxílicos (Haag *et al.*, 2013).

Una vez dentro de las células de nódulos, las bacterias continúan diferenciándose y sintetizando proteínas necesarias para la fijación de nitrógeno y del mantenimiento de la asociación mutualista (Gage, 2004) (Figura 3).

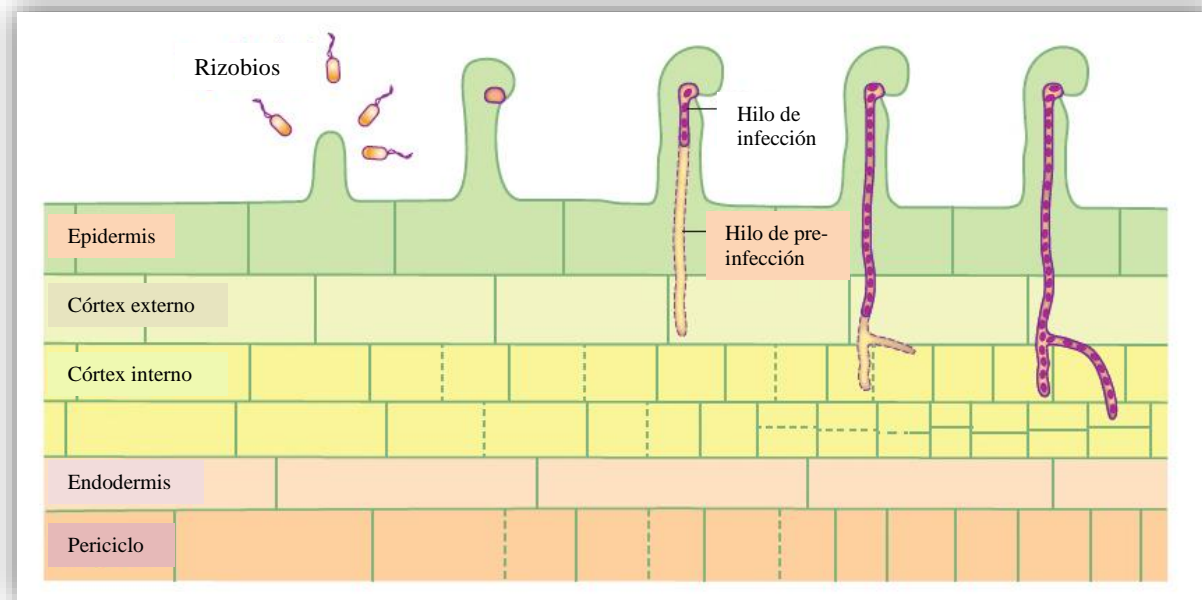


Figura 3. Proceso de infección y formación del hilo de infección por los rizobios en los pelos radicales de las leguminosas (Oldroyd *et al.*, 2011).

En la agricultura destacan los rizobios del género *Rhizobium*, que incluye especies importantes para la agricultura empleadas como biofertilizantes, siendo el primer género bacteriano producido a gran escala para ser utilizado como inoculante en diversos cultivos agrícolas (Villanueva-Tarazona y Quintana-Díaz, 2012).

2.5.2 Plantas leguminosas utilizadas en esta investigación

Dentro de las leguminosas de mayor importancia económica y alimenticia se encuentra *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común); esta planta originaria de América es la tercera leguminosa más cultivada en el mundo (Rouhrazi *et al.*, 2016). Es una especie adaptada a climas tropicales y templados en un amplio rango de altitudes desde los 50 hasta

2300 m, que además crece en casi todos los tipos de suelo, excepto los alcalinos (Muñoz-Saldaña, 2010). Debido a su alta promiscuidad, *P. vulgaris* puede establecer simbiosis con las bacterias fijadoras de nitrógeno, tales como *Rhizobium etli*, *R. tropici*, *R. gallicum*, *R. lusitanum*, *R. phaseoli*, *R. azibense*, *R. freirei*, *Sinorhizobium meliloti*, *S. americanum*, y *Bradyrhizobium* sp., entre otros (Rouhrazi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Por su parte, la soya (*Glycine max* (L.) Merr) es otro de los cultivos más importantes en la agricultura mundial, debido a su alto contenido de proteína y aceite en su semilla (Maldonado-Moreno y Ascencio-Luciano, 2010). El cultivo de soya representa el 80% del área utilizada para el cultivo de leguminosas en el mundo (Namala *et al.*, 2016). En México, la soya se cultiva en una superficie aproximada de 75 241 ha, con una producción de 152 283 t y un valor aproximado de 685 273 millones de pesos. Las principales zonas de producción de soya se localizan en áreas de temporal de los estados de Tamaulipas, Chiapas, San Luis Potosí, seguidos por Veracruz, Campeche, Chihuahua y Jalisco (García-Rodríguez *et al.*, 2014; Maldonado-Moreno y Ascencio-Luciano, 2010).

La soya forma simbiosis con diversos grupos bacterianos que pertenecen a los géneros *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) y *Mesorhizobium*; también establece simbiosis con: *Bradyrhizobium elkanii*, *B. liaoningense*, *B. yuanmingense* y *B. japonicum*, especies de lento crecimiento (Mapope y Dakora, 2016; Namala *et al.*, 2016).

2.6 Discusión general de la revisión de la literatura

La alelopatía es un fenómeno que involucra la producción de MS que influyen en el crecimiento y en el desarrollo de plantas y microorganismos. Los compuestos como flavonoides, fenoles y alcaloides, entre otros, funcionan como alelopáticos y dependiendo

de su naturaleza química, concentración y sensibilidad del organismo receptor, así como las condiciones ambientales, ejercen su actividad biológica.

Los efectos de los compuestos alelopáticos son diversos e influyen en diversos procesos como el establecimiento de las comunidades vegetales, el ciclo de los nutrientes en el suelo, los procesos fisiológicos de las especies receptoras y comunidades microbianas. La aplicación de la alelopatía ha sido importante en los agroecosistemas, ya que mediante el uso de diversos cultivos de cobertura o el intercalado de éstos, se ha logrado manejar eficientemente la presencia de las malezas.

Ipomoea purpurea (L.) Roth es una planta enredadera presente en cultivos entre los que se incluye frijol y soya, leguminosas de importancia alimenticia y económica mundial. Ambas leguminosas, forman simbiosis con grupos bacterianos como los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, respectivamente, los cuales son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico.

Con base en lo anterior, es importante indagar sobre los efectos que genera la interacción de una planta con potencial alelopático como *I. purpurea* (planta donadora) en frijol común (*P. vulgaris*) y soya (*G. max*) (plantas receptoras), asociados a bacterias fijadoras de nitrógeno, ya que puede tener un efecto nocivo o estimulante en el crecimiento, en la respuesta fisiológica, así como en la concentración y acumulación nutrimental de las plantas receptoras.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el potencial alelopático de *Ipomoea purpurea* L. Roth en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y de soya (*Glycine max* (L.) Merr.) inoculadas con rizobios.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar en condiciones *in vitro* el efecto alelopático de los lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* L. Roth. en la germinación y longitud radical de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* (L.) Merr.).
- Evaluar el crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 ante los lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* L. Roth.
- Comparar el crecimiento y respuesta fisiológica de *Phaseolus vulgaris* L. y *Glycine max* (L.) Merr. inoculadas con *Rhizobium tropici* y *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente, al incorporar *Ipomoea purpurea* L. Roth.
- Determinar la concentración y acumulación nutrimental de *Phaseolus vulgaris* L. y *Glycine max* (L.) Merr. inoculadas con *R. tropici* y *B. japonicum*, respectivamente, al incorporar *I. purpurea*.

IV. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis general

Ipomoea purpurea (L.) Roth ejerce un efecto alelopático en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* (L.) Merr.), afectando el establecimiento de la simbiosis con rizobios.

4.2 Hipótesis particulares

- Los lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. afectan la germinación y longitud radical de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y de soya (*Glycine max* (L.) Merr.) en condiciones *in vitro*.
- Los lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth inhiben el crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Bradyrhizobium japonicum* USDA110.
- El crecimiento y respuesta fisiológica de frijol y soya inoculadas con *Rhizobium tropici* y *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente, es afectado por la incorporación de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth.
- La concentración y acumulación nutrimental de *Phaseolus vulgaris* L. y *Glycine max* (L.) Merr. inoculadas con *Rhizobium. tropici* y *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente, es influenciada por la incorporación de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

FASE I. Bioensayo con el lixiviado acuoso de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth.

5.1 Material vegetal

Las semillas de *Ipomoea* se recolectaron de las inmediaciones del Colegio de Postgraduados y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 6% durante 5 minutos. Posteriormente, las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar los residuos de dicha solución y sembradas en recipientes con agrolita como sustrato. El crecimiento de *Ipomoea* se realizó en una cámara bioclimática Sherer-Gillett Co. Marshall Mich (modelo No. 3714), con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad, con temperatura de 25°C, humedad relativa del 56% y una intensidad luminosa de 137 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ durante cuatro meses.

Las semillas de soya pertenecían a la variedad Huasteca 100, donadas por el Centro de Innovación Tecnológica “Campo Cayal” Campeche, Campeche y las semillas de frijol, correspondieron a la variedad Flor de Mayo de origen comercial (marca Schettino®). Para su uso se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 6% durante 5 min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril, hasta retirar el exceso de la solución desinfectante.

5.2 Preparación de lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea*

En un matraz Erlenmeyer fueron colocados 20 g por separado de la parte aérea (tallos y hojas) y raíz fresca de *Ipomoea*. Se adicionaron 100 mL de agua destilada estéril y se dejó reposar durante 3 h para extraer los compuestos hidrosolubles y se agitó vigorosamente cada 60 min. La solución resultante (20%) se filtró con papel Whatman

número 4 y posteriormente filtrada a través de una membrana Milipore de 0.22 μm Millex[®]-GS para obtener un lixiviado estéril (Figura 4).



Figura 4. Proceso de obtención y filtrado de los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea de *Ipomoea purpurea* L. Roth.

5.3 Germinación de las semillas de frijol y soya

Las semillas de frijol (flor de mayo) y soya (Huasteca 100) se germinaron en cajas Petri con una mezcla de agar al 2% y cada uno de los lixiviados acuosos de *I. purpurea* al 8, 16 y 30% para obtener una concentración final de 4, 8 y 15%. Como grupo control se mezclaron 10 mL de agua destilada estéril y 10 mL de agar al 2%. Una vez solidificado el agar, se colocaron 36 semillas por tratamiento. Cada una de las cajas fue sellada con Parafilm y colocadas en un incubadora a 28°C en total oscuridad. Se llevó a cabo el conteo de semillas germinadas, así como la medición de la emergencia radicular a las 24 y 48 h. Todo el procedimiento se realizó en campana de flujo laminar marca VECO[®] para mantener condiciones estériles (Figura 5).

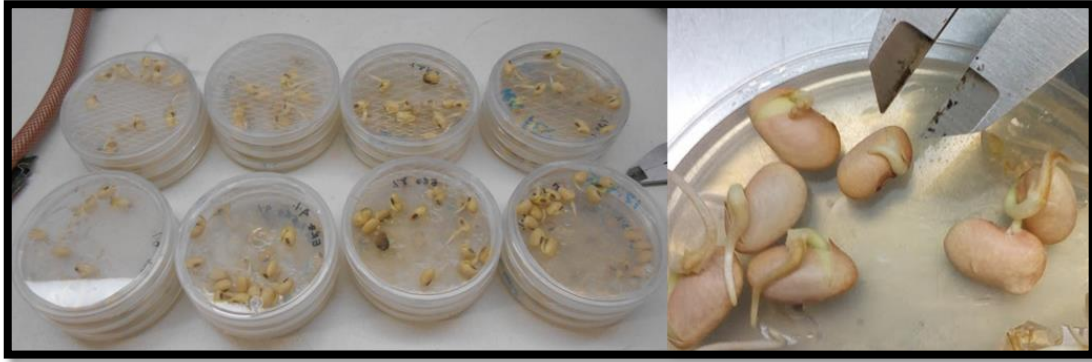


Figura 5. Germinación de semillas de frijol y soya frente a los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea de *Ipomoea purpurea* L. Roth.

5.4 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, cada unidad experimental constó de 12 semillas con tres repeticiones para cada concentración de los lixiviados. Los datos se sometieron a un análisis de varianza con la posterior prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$), en el programa SAS versión 9.4.

FASE II Crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici* y *Bradyrhizobium japonicum* expuestas al lixiviado acuoso de *Ipomoea purpurea*

En cajas Petri con medio de cultivo ELMARC (Extracto de Levadura Manitol y Rojo Congo, Apéndice 1), se vertieron y diseminaron con una espátula de Drigalsky 100 μ L del inóculo bacteriano de *R. tropici* CIAT 899 y *B. japonicum* USDA110, previamente cultivados en medio CELM (Caldo de Extracto Levadura Manitol, Apéndice 2) respectivamente. Posteriormente, en cada placa se realizaron tres pozos con ayuda de un sacabocados para después depositar en cada uno 50 μ L de lixiviado a probar (Figura 6).

Tanto del lixiviado acuoso de la raíz como de la parte aérea, se prepararon las concentraciones de 4, 8, y 15%. Cada una de las concentraciones de los lixiviados tuvo tres repeticiones. Las muestras se incubaron a 28°C durante tres días para *R. tropici* y cinco días para *B. japonicum*. Pasado este tiempo se revisaron y midieron los halos de inhibición en aquellas muestras en que se presentaron.

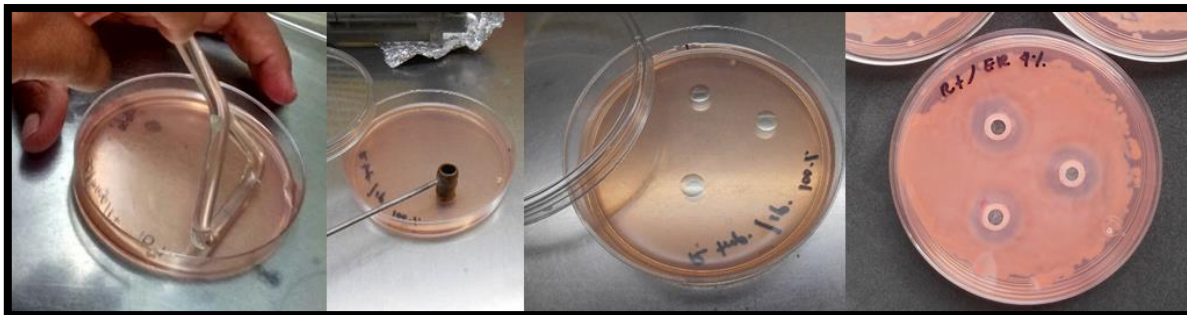


Figura 6. Siembra *in vitro* de *R. tropici* y *B. japonicum* frente a los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth.

5.5. Diseño experimental y análisis estadístico

En esta fase, el diseño experimental fue completamente al azar, y se comparó la respuesta por separado de cada uno de los lixiviados a las 72 h con *R. tropici* y a las 120 h con *B. japonicum* y se realizó un análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$).

FASE III. Crecimiento y respuesta fisiológica de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y soya (*Glycine max*) inoculadas con rizobios y su interacción con *Ipomoea purpurea*

5.6 Ubicación y condiciones experimentales

El presente trabajo de investigación se realizó en la Unidad de Cámaras de Ambiente Controlado, bajo la responsabilidad del Departamento de Campos Experimentales del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El experimento se mantuvo en una cámara bioclimática Sherer-Gillett Co. Marshall Mich modelo No. 3714, con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad, con temperatura de 25°C, humedad relativa del 56% y una intensidad luminosa de 137 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

5.7 Material vegetal

Las semillas de soya pertenecían a la variedad Huasteca 100, donadas por el Centro de Innovación Tecnológica “Campo Cayal” Campeche, Campeche. Las semillas de frijol, correspondieron a la variedad Flor de Mayo de origen comercial (marca Schettino®).

Las semillas de *Ipomoea* fueron recolectadas en las inmediaciones del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo; fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 6% durante 5 minutos y posteriormente enjuagadas con agua destilada estéril hasta eliminar los residuos de dicha solución. Se sembraron en recipientes con agrolita como sustrato y su crecimiento fue en cámara bioclimática, bajo las condiciones anteriormente mencionadas durante un mes.

5.8 Diseño experimental y tratamientos

El experimento para cada leguminosa, consistió de un diseño factorial 2²; cuyos factores de estudio fueron: 1) inoculación bacteriana (con o sin inoculo), y 2)

incorporación de *Ipomoea* (con o sin planta alelopática). Para cada leguminosa se consideraron cuatro tratamientos con doce repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. El análisis estadístico incluyó el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$). En todos los procedimientos se utilizó el programa SAS, versión 9.4.

5.9 Instalación del experimento

El establecimiento del experimento se basó en lo propuesto por Rodríguez-Mendoza (1993) y consistió en ocupar como macetas recipientes de poliestireno (cap. 500 mL) los cuales se llenaron con agrolita estéril (121°C, 3 h) como sustrato. Las semillas de frijol y soya se desinfectaron previamente con una solución 6% NaClO durante 3 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril por tres ocasiones. Al mismo tiempo de la siembra fue incorporada la plántula de *Ipomoea* de 1 mes de edad, en los tratamientos correspondientes (Figura 7).

Una vez germinadas las semillas de frijol y soya, se realizó la inoculación de los tratamientos que así lo requerían, se adicionó 1 mL de inóculo por planta. La obtención del inóculo bacteriano se obtuvo mediante la siembra de *R. tropici* CIAT899 y *B. japonicum* USDA110 en medio CELM con carga bacteriana de 7.3×10^{11} UFC mL⁻¹ y 1.3×10^{12} UFC mL⁻¹, respectivamente (Figura 7).

El riego consistió en 20 mL de agua destilada estéril dos veces por semana, también se adicionaron a cada maceta, 20 mL de solución nutritiva Jensen (Apéndice 3) una vez a la semana. Cada uno de los experimentos tuvo una duración de 35 días.



Figura 7. Establecimiento de frijol y soya en presencia de *Ipomoea* de un mes de crecimiento e inoculación bacteriana.

5.10 Activación y elaboración de los inóculos de *Rhizobium tropici* y *Bradyrhizobium japonicum*

Las cepas *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, fueron activadas en cajas de Petri con medio de cultivo ELMARC (Apéndice, 1) e incubadas a 28 °C, durante 3 y 5 días, respectivamente.

El inóculo de las bacterias se preparó en medio líquido CELM (Apéndice, 2), su incubación se llevó a cabo en un agitador orbital MaxQ™ 4000 USA a 28 °C y a 180 rpm ($0.72 \times g$), en las condiciones anteriormente mencionadas. Posteriormente, se realizó el procedimiento para obtener el pellet bacteriano, que consistió en centrifugar el inóculo a 7500 rpm ($1194.86 \times g$) durante 15 min, se retiró el exceso de medio de cultivo y se reemplazó por agua destilada estéril, para “enjuagar” las bacterias, y el enjuague se repitió por tres ocasiones. Finalmente, se agregó un volumen conocido de agua destilada estéril y las plántulas de frijol y soya, se inocularon con 1 mL de esta solución.

Para conocer la carga bacteriana de los inóculos, se procedió a realizar el conteo en placa, a través de diluciones seriadas, de la siguiente manera: un mililitro de inóculo más 9 mL de agua destilada estéril conformó la dilución 1×10^{-1} ; de ésta, se tomó 1 mL y se

adicionaron 9 mL de agua destilada estéril, para conformar la dilución 1×10^{-2} . El procedimiento anterior se repitió hasta obtener la dilución 1×10^{-9} . De cada una de las diluciones, se tomaron 100 μ L, para realizar la siembra en placa mediante la diseminación de la muestra con una espátula de Drigalsky. Las placas de *R. tropici* se incubaron por 3 días y las de *B. japonicum* por 5 días, ya que son de rápido y de lento crecimiento, respectivamente.

5.11 Variables de estudio

5.11.1 Variables de crecimiento

Una vez transcurridos los 35 días de crecimiento, las plantas fueron cosechadas y se evaluó altura de la planta (con un flexómetro), diámetro del tallo (usando un vernier digital), volumen de la raíz (método de desplazamiento de volumen), área foliar (con el equipo LICOR model 3100 USA) y el peso seco de la raíz y de la parte aérea (con una balanza analítica). Posteriormente, se colocaron bolsas de papel para su secado en estufa durante 72 h a 70 °C. Después, se obtuvo la biomasa seca. Así mismo se contabilizaron los nódulos de los tratamientos inoculados.

5.11.2 Variables fisiológicas

Al final de cada uno de los experimentos se determinó la concentración de clorofila total (mg g^{-1} peso fresco), de acuerdo al método propuesto por Harborne (1998). A partir de una muestra de tres plantas, de cada tratamiento, se pesaron 0.5 g de hojas frescas finamente picadas, se adicionaron 10 mL de acetona al 80% y se dejaron reposar 24 h en frascos ámbar. Posteriormente, cada muestra se maceró y filtró. Finalmente, se aforó a 25 mL con acetona al 80%. La absorbancia de los extractos se leyó en un espectrofotómetro HP-UV Visible ChemStations, Agilent 8453, a 663 y 645 nm.

La concentración de clorofila se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila total} = \frac{(8.20(A_{663}) + 20.2(A_{645})) * V}{1000 * P}$$

Dónde:

C= Concentración (mg g⁻¹peso fresco)

A = Absorbancia, los subíndices indican la longitud de onda (645 y 663 nm).

V= Volumen aforado (mL)

P= Peso de muestra (g)

1000 = Factor de conversión

Así mismo, al término del cada experimento, y a partir de una muestra de cinco plántulas de cada tratamiento se calculó la tasa fotosintética ($P_n = \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), la tasa de transpiración ($E = \text{nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y la conductancia estomática ($g_s = \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) con el equipo CIRAS 2 (Portable Photosynthesis System). La fluorescencia de la clorofila α , se determinó con un Fluorómetro OS30p, Opti-Sciences, una vez que se mantuvieron las hojas en la oscuridad durante 20 minutos. Todas las determinaciones se realizaron en la segunda a tercera hoja del ápice a la base de cada planta alrededor de las 9:00 am.

5.12 Determinación de actividad nitrogenasa (EC 1.18.6.1)

La actividad nitrogenasa en los nódulos de aquellos tratamientos de frijol y soya inoculados, se midió con la prueba de reducción de acetileno a etileno (C_2H_4) tomando tres unidades experimentales de cada tratamiento. Una vez retirado el exceso de sustrato, las raíces se separaron de la parte aérea, y transferidas a recipientes de 1000 mL de capacidad, por separado. Los frascos se taparon, y con una jeringa se tomaron 100 mL de aire y

remplazados por 100 mL de acetileno. Después de 1 h, se tomó una muestra de 5 mL del contenido de cada uno de los frascos y vertidos en tubos Vacutainer al vacío (capacidad de 7 mL) para su conservación. Posteriormente, cada una de las muestras se procesaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 (Series II Gas Chromatograph, USA), con detector de ionizador de flama, para medir la reducción de acetileno a etileno.

FASE IV. Concentración y acumulación nutrimental en vastagos y raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y soya (*Glycine max*) inoculadas con rizobios y su interacción con *Ipomoea purpurea*

El análisis nutrimental de nitrógeno (N) se realizó mediante el método Kjeldahl, a través de la digestión con mezcla Ácida (ácido sulfúrico-salicílico), destilación y valoración por titulación de la muestra. La determinación de fósforo (P) y potasio (K) se hizo en el extarcto resultante de digestión acida (ácidos nítrico y perclórico), en un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-OES, 725-ES Series, Agilent) (Alcántar-González y Sandoval-Villa, 1999). El diseño experimental y tratamientos fue el mismo de la fase III, con la aplicación de un ANOVA y prueba de medias (Tukey, $\alpha=0.05$).

VI. RESULTADOS

FASE I. Bioensayo con el lixiviado acuoso de *Ipomoea purpurea* en la germinación y longitud radical de frijol y soya

6.1.1 Efecto de los lixiviados de *Ipomoea purpurea* en la germinación de semillas y emergencia de plántulas de frijol.

La aplicación del lixiviado acuoso de la raíz de *Ipomoea* a las 24 h, no tuvo efecto significativo en la germinación de las semillas de frijol (Figura 8A). Sin embargo, después de 48 h, la estimulación en la germinación fue significativa, en particular con la aplicación de dicho lixiviado al 15% (Figura 8A). En el caso de la aplicación del lixiviado de la parte aérea de *Ipomoea*, a las 24 h, la aplicación de 4% de lixiviado produjo una estimulación en la germinación, sin ser estadísticamente diferente al testigo; mientras que, a las 48 h todas las concentraciones del lixiviado estimularon significativamente la germinación con respecto al control, sobresaliendo la concentración de 4 % (Figura 8B).

En general, se observó una relación positiva entre la longitud radical de las plántulas de frijol y la concentración del lixiviado de la raíz; sin embargo, no existió diferencia significativa entre tratamientos en los dos tiempos de evaluación (Figura 9A). Se observó que al 4 y 15%, el lixiviado acuoso de la parte aérea, produjo un aumento significativo en la longitud radical de las plántulas de frijol después de 24 h (Figura 9B). No obstante, a las 48 h no se detectaron diferencias en las concentraciones de dicho lixiviado (Figura 9B).

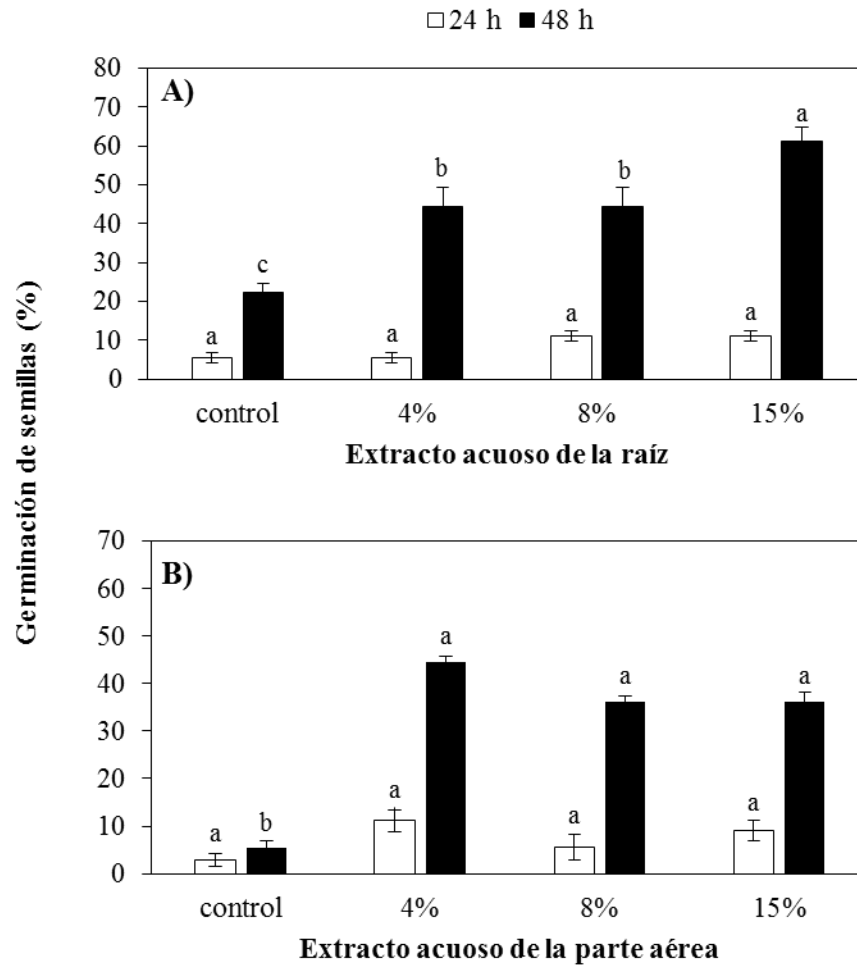


Figura 8. Porcentaje de germinación de las semillas de frijol expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de parte aérea (B) de *Ipomoea purpurea* a las 24 y 48 h. Medias \pm error estándar con letras distintas en cada tiempo de muestreo, en cada subfigura indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

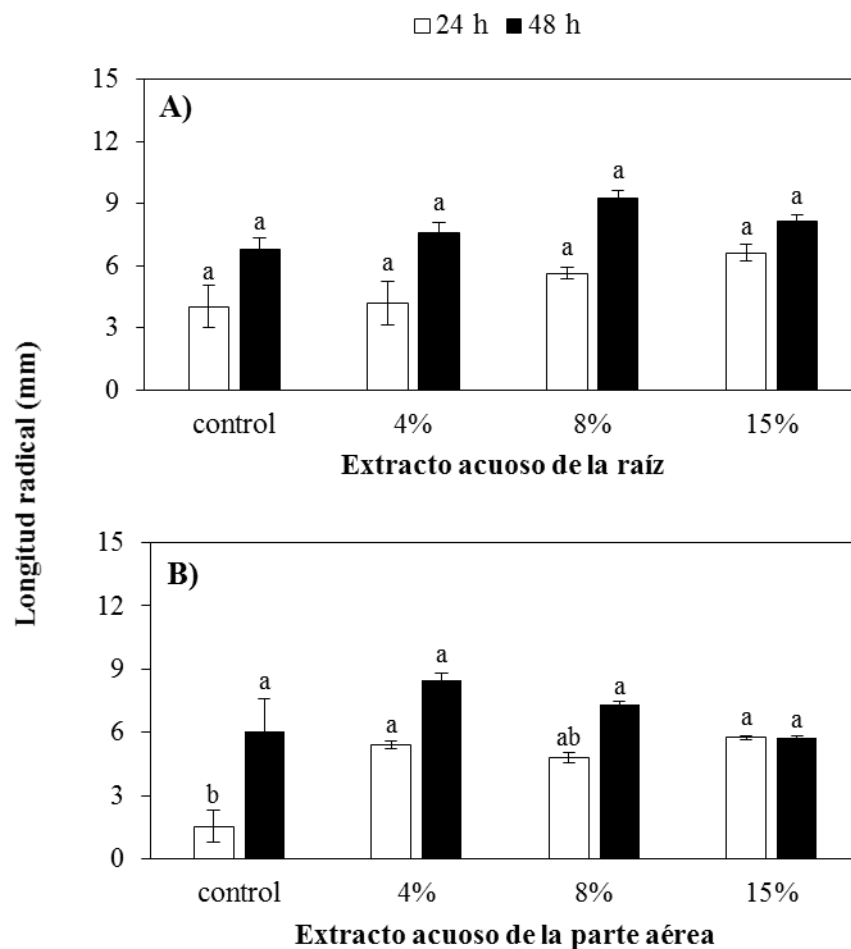


Figura 9. Longitud radical (mm) de las plántulas de frijol expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de la parte aérea (B) de *Ipomoea purpurea* a las 24 y 48 h. Medias \pm error estándar con letras distintas en cada tiempo de muestreo, en cada subfigura indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

6.2 Efecto de los lixiviados de *Ipomoea purpurea* en la germinación de semillas y emergencia de plántulas de soya

Cuando las semillas de soya fueron expuestas al lixiviado acuoso de la raíz de *Ipomoea*, no se observaron diferencias significativas en la germinación de soya (Figura

10A). Sin embargo, con la aplicación del lixiviado acuoso de la parte aérea al 15% de su concentración, redujo a las 24 h de manera significativa el porcentaje de germinación (Figura 10B).

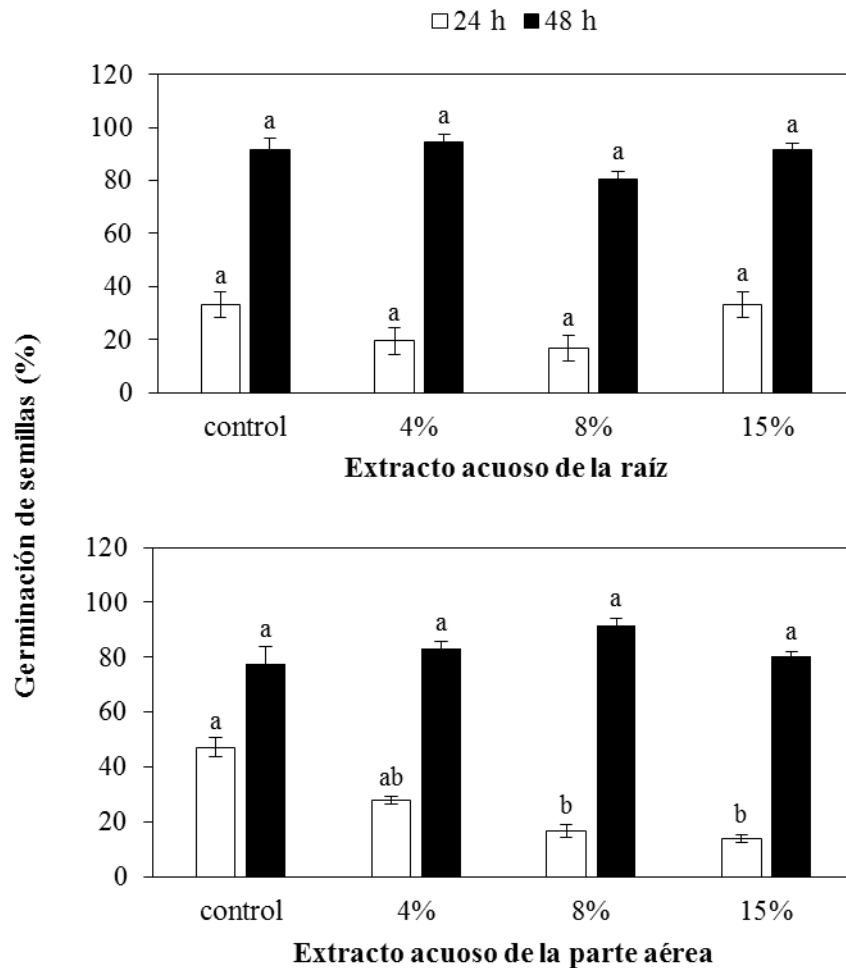


Figura 10. Porcentaje de germinación de las semillas de soya expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de parte aérea (B) de *Ipomoea purpurea* a las 24 y 48 h. Medias \pm error estándar con letras distintas en cada tiempo de muestreo, en cada subfigura indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

La longitud radical de las plántulas de soya en los dos muestreos realizados, no fue influenciada por el lixiviado acuoso de la raíz de *Ipomoea* (Figura 11A). Por el contrario, a las 24 h el lixiviado de la parte aérea al 15% redujo la longitud radical, en comparación con el control (Figura 11B).

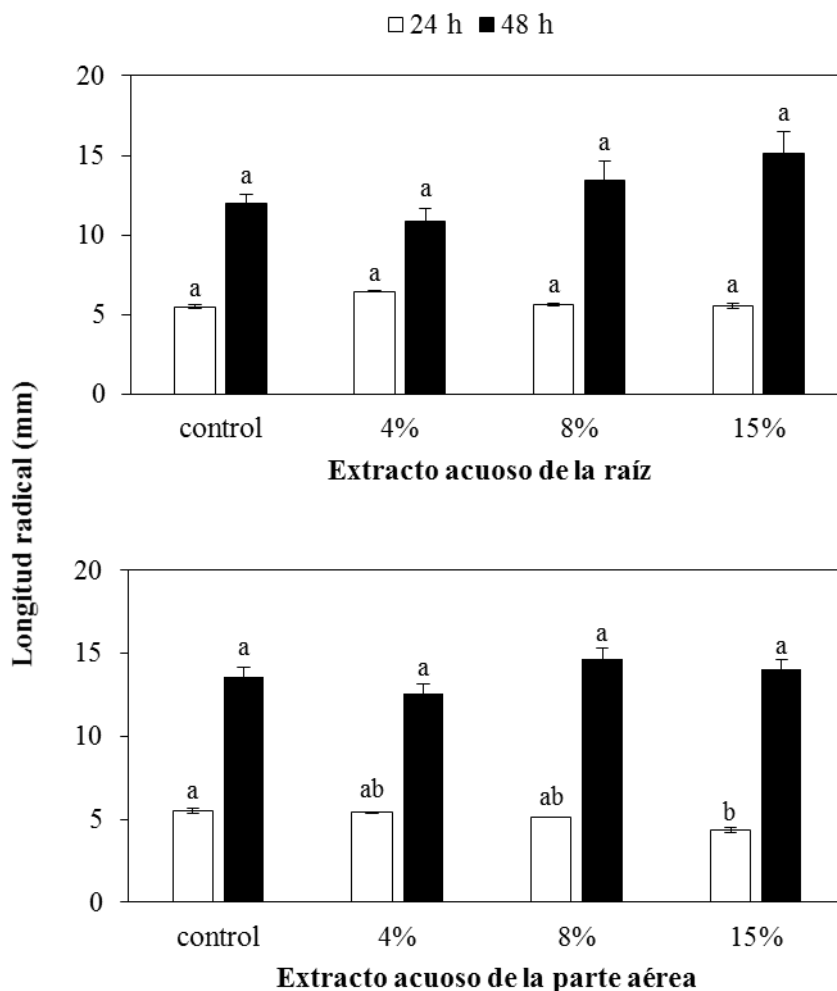


Figura 11. Longitud radical de las plántulas de soya expuestas a tres concentraciones (4, 8 y 15%) de los lixiviados acuosos de raíz (A) y de la parte aérea (B) de *Ipomoea* a las 24 y 48 h. Medias \pm error estándar con letras distintas en cada tiempo de muestreo, en cada subfigura indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

FASE II. Efecto de lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* en el crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici* CIAT899 y *B. japonicum* USDA110.

La aplicación del lixiviado acuoso tanto de raíz como de la parte aérea de *Ipomoea*, inhibió significativamente el crecimiento de *R. tropici*. En el caso del lixiviado de raíz, la mayor inhibición se obtuvo al aplicar el lixiviado al 8 % de su concentración; mientras que, para el lixiviado obtenido de la parte aérea, la inhibición aumentó conforme la concentración del lixiviado se incrementó en el medio de cultivo (Figura 12). Por otra parte, el crecimiento de *B. japonicum* no fue afectado por los lixiviados acuosos de la raíz y la parte aérea de *Ipomoea* (datos no presentados).

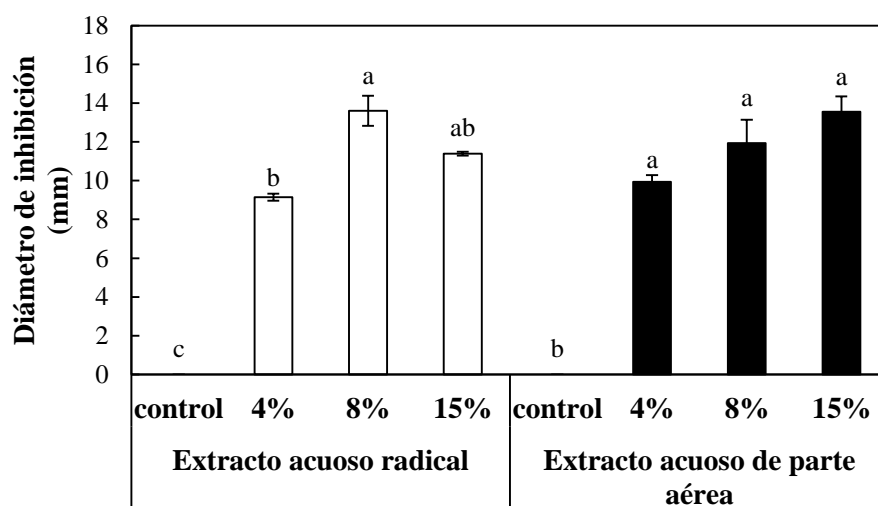


Figura 12. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici* en presencia de los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea de *Ipomoea purpurea* aplicados en las concentraciones de 4, 8 y 15%, después de 72 h de cultivo. Medias \pm error estándar con letras distintas en cada subfigura indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

FASE III. Crecimiento y respuesta fisiológica de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* (L.) Merr.) inoculadas con rizobios, en presencia de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth

6.3 Efectos en frijol

Independientemente de la presencia de *I. purpurea*, la inoculación con *R. tropici* incrementó significativamente la altura, el volumen radical y la biomasa seca total de las plantas de frijol (Figura 13A, 13C y 13D). En contraste, la incorporación de *Ipomoea*, redujo de manera significativa la altura y el volumen radical de las plantas de frijol (Figuras 13A y 13C), respecto al testigo. No se obtuvieron diferencias significativas en el diámetro de tallo, ni en el área foliar de plantas de frijol por efecto de la inoculación de *R. tropici* ni por efecto de la presencia de *Ipomoea* (Figura 13B y 13E).

El contenido de clorofila total tuvo un aumento significativo en el tratamiento inoculado con *R. tropici* (Figura 14A). La tasa fotosintética (Figura 14B), la conductancia estomática (Figura 14C), y la transpiración (Figura 14D) fueron significativamente estimulados por la inoculación de *R. tropici*. En contraste, las plantas de frijol con la presencia de *I. purpurea* mostraron una disminución en las tres variables mencionadas, aunque la presencia de *R. tropici*, atenuó el efecto inhibitorio de la planta alelopática (Figura 14B-C). La eficiencia del fotosistema II medida con base en la relación entre la fluorescencia variable y máxima (F_v/F_m) no mostró diferencias significativas entre tratamientos (Figura 14E).

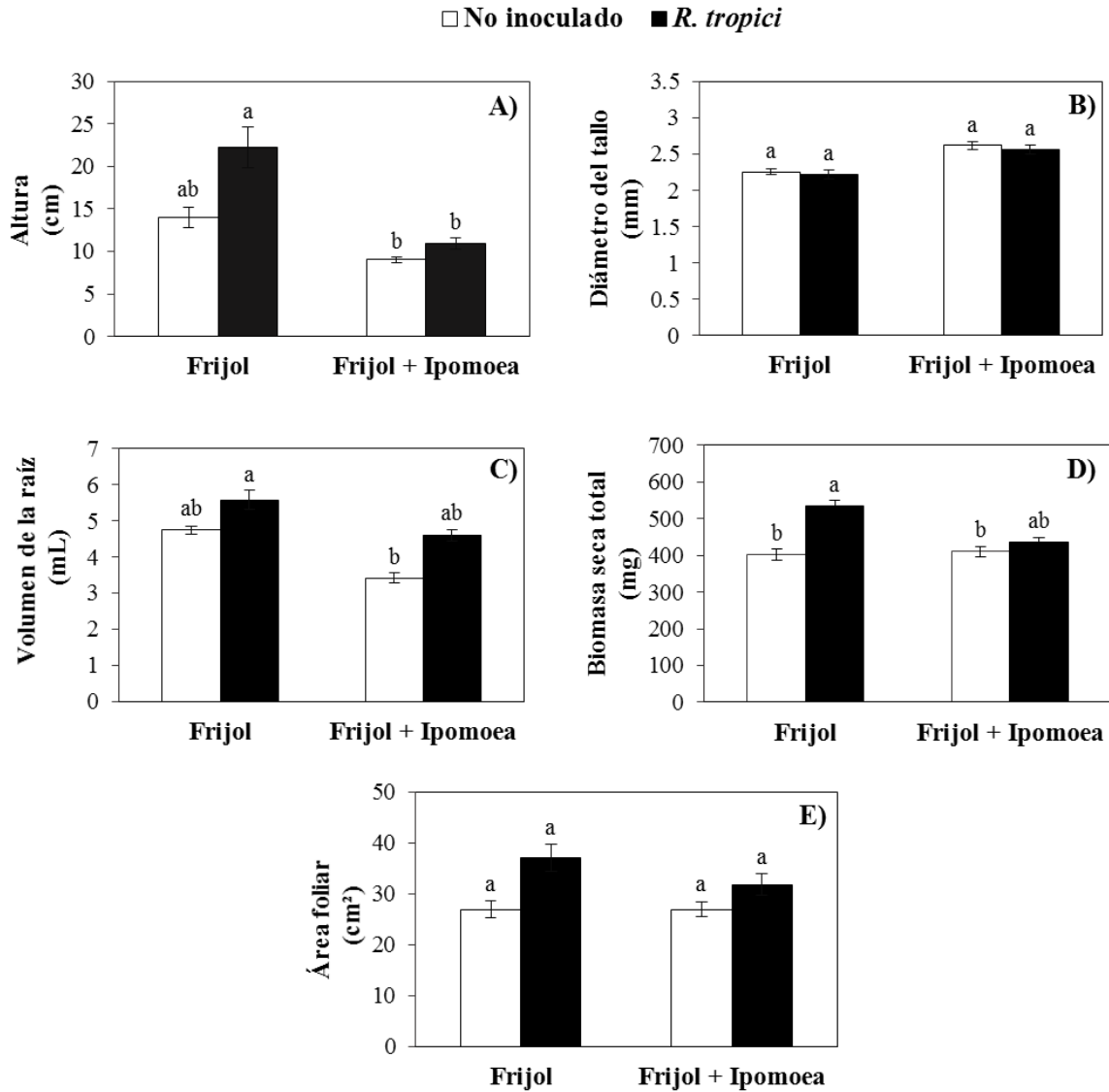


Figura 13. Respuesta de crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. inoculado con *Rhizobium tropici* CIAT899, en presencia de *Ipomoea purpurea* L. Roth, después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado. Medias ± error estándar con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

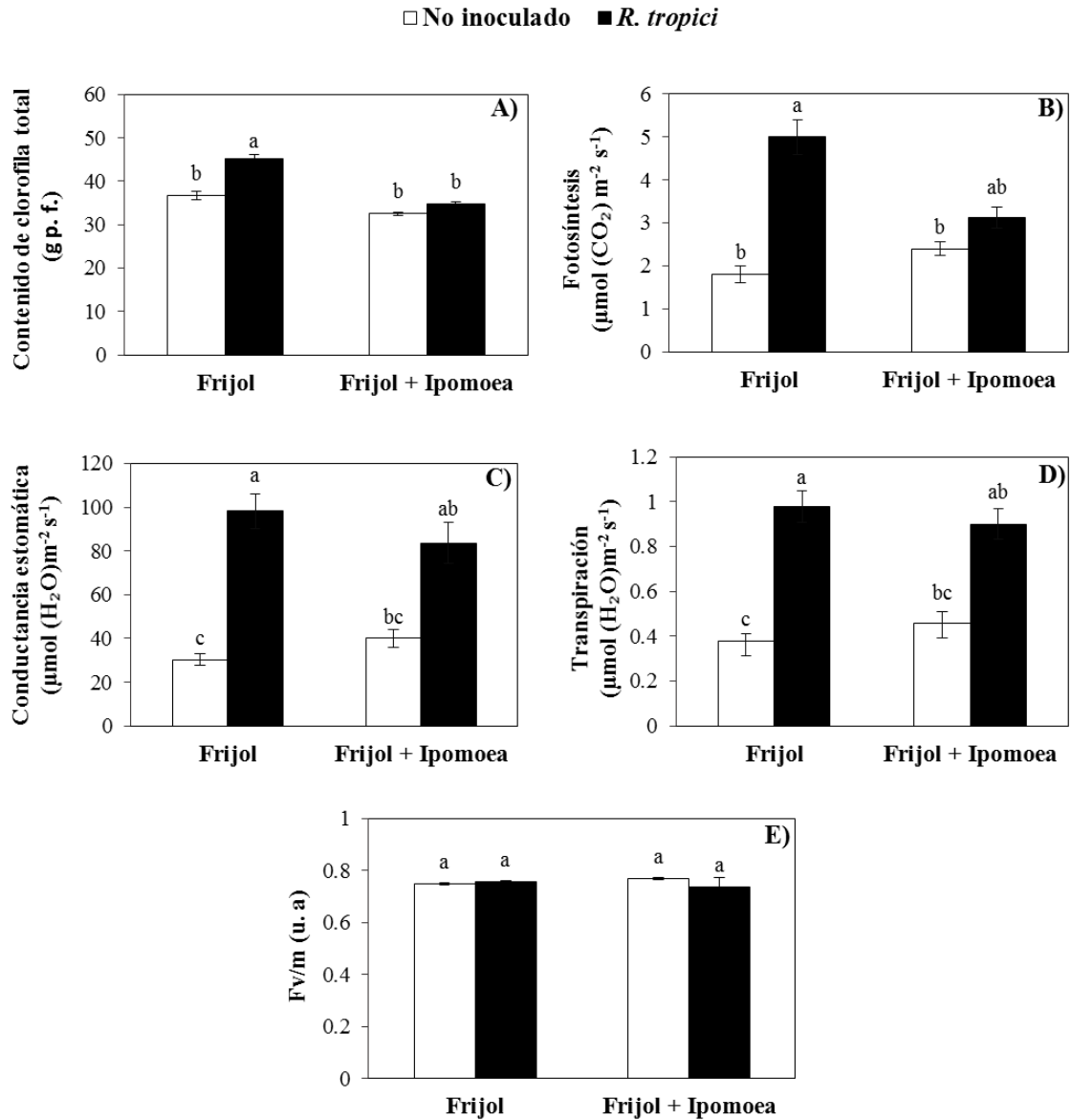


Figura 14. Efecto en las variables fisiológicas relacionadas con el contenido de clorofila total, intercambio gaseoso y eficiencia cuántica del PSII en plantas de frijol, inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899, en presencia de *Ipomoea purpurea*, después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado. Medias \pm error estándar con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

La nodulación de las plantas inoculadas con *R. tropici* fue significativamente disminuida por *Ipomoea* (Figura 15A), cuya presencia resultó en un menor número de nódulos en la raíz; sin embargo, la biomasa seca nodular no mostró diferencias significativas con respecto a las plantas con la presencia de *I. purpurea* (Figura 15B). La actividad nitrogenasa del sistema radical de plantas de frijol fue inhibida significativamente por la presencia de *Ipomoea* (Figura 15C).

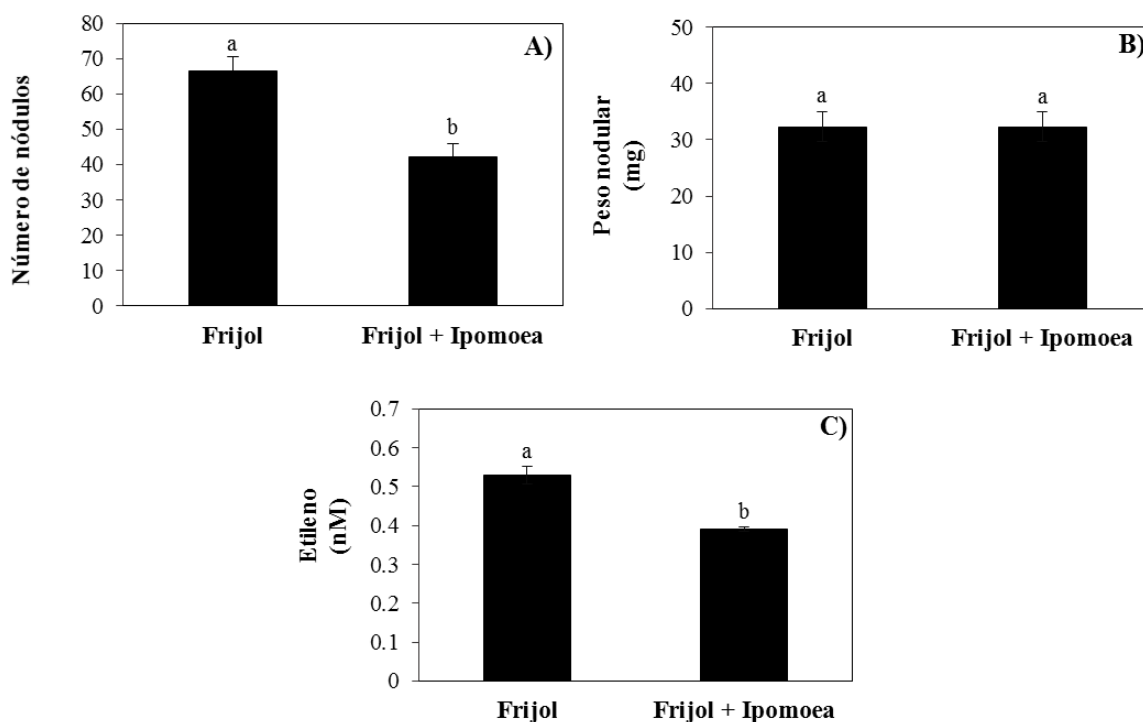


Figura 15. Número de nódulos (A), peso seco nodular (B) y cantidad de etileno reducido por acción de la enzima nitrogenasa (C) de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado. Medias \pm error estándar con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

6.4 Efectos en soya

A pesar de la inoculación y de la incorporación de *I. purpurea*, en soya no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en las variables altura, diámetro del tallo y volumen radical de las plantas de soya (Figuras 16A a 16C); no obstante, destacan ligeros incrementos no significativos en altura y volumen de la raíz con la inoculación de *B. japonicum* en ausencia de la planta alelopática (Figuras 16A y 16C). Independientemente de la incorporación de *I. purpurea*, la inoculación ocasionó el incremento significativo en el peso de la biomasa seca total de plantas de soya (Figura 16D); en contraste, el área foliar incrementó en presencia de *I. purpurea* y la inoculación de *B. japonicum*, respecto al testigo (Figura 16E).

En general, las plantas alelopáticas producen efectos negativos en el crecimiento y fisiología de las plantas receptoras, tal como se observó en las plantas de frijol con o sin la inoculación de *R. tropici*. Del mismo modo, la presencia de *I. purpurea* en las plantas de soya sin inocular produjo una disminución de los valores de contenido de clorofila total, conductancia estomática y transpiración, principalmente (Figuras 17A, 17C y 17D). Sin embargo, se observó que la presencia de *I. purpurea* en las plantas de soya inoculadas con *B. japonicum* incrementaron los valores de fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración y la concentración de clorofila (Figura 17A-D), aunque este incremento solo fue significativo en esta última. De la misma manera, no se observaron diferencias significativas en la eficiencia del fotosistema II en las plantas de soya, sin embargo, el valor más alto se registró en presencia de la planta alelopática (Figura 17E).

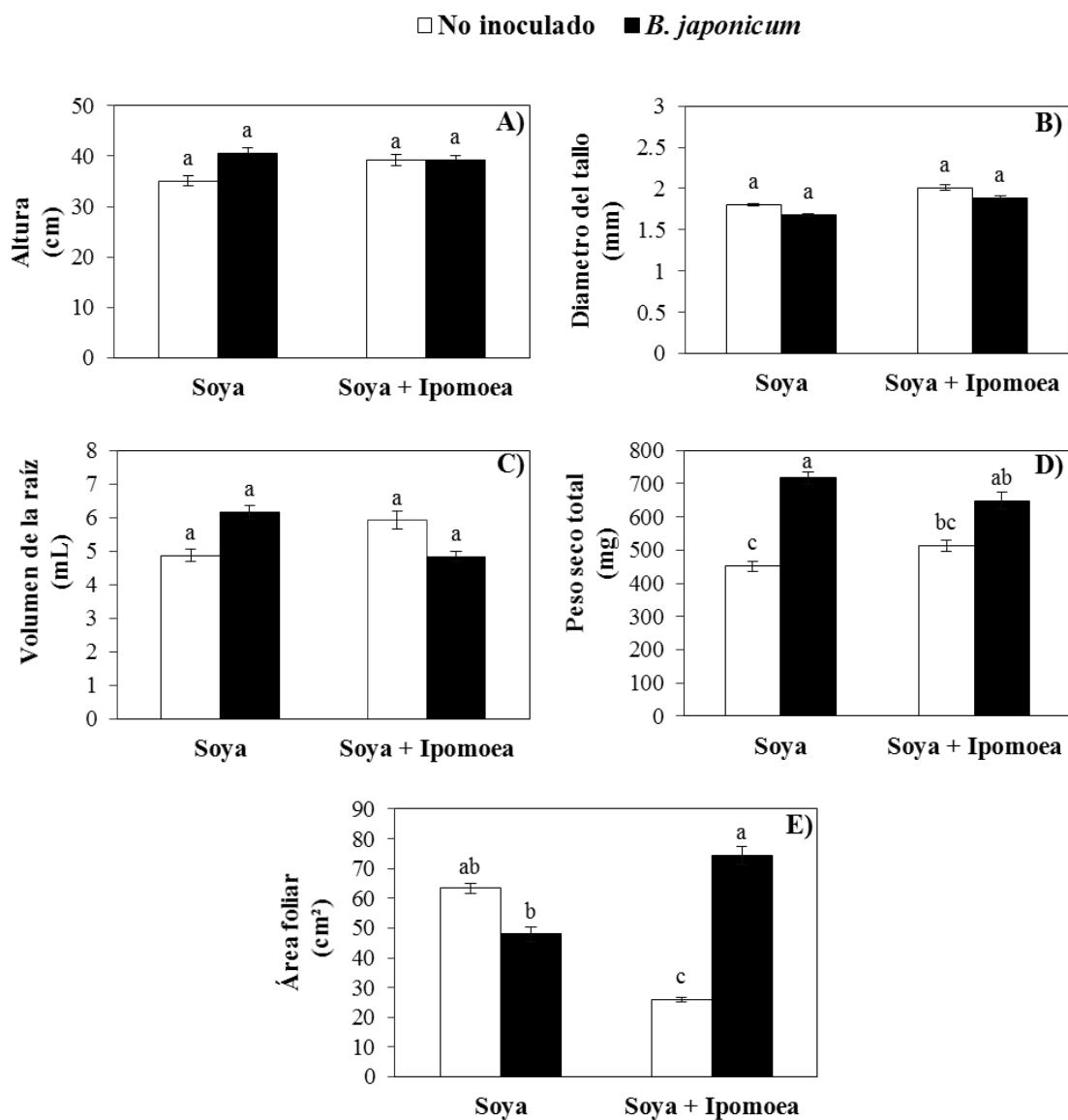


Figura 16. Respuesta de crecimiento de soya inoculada con *B. japonicum* USDA110, en presencia de *Ipomoea purpurea* L. Roth, después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado. Medias \pm error estándar con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

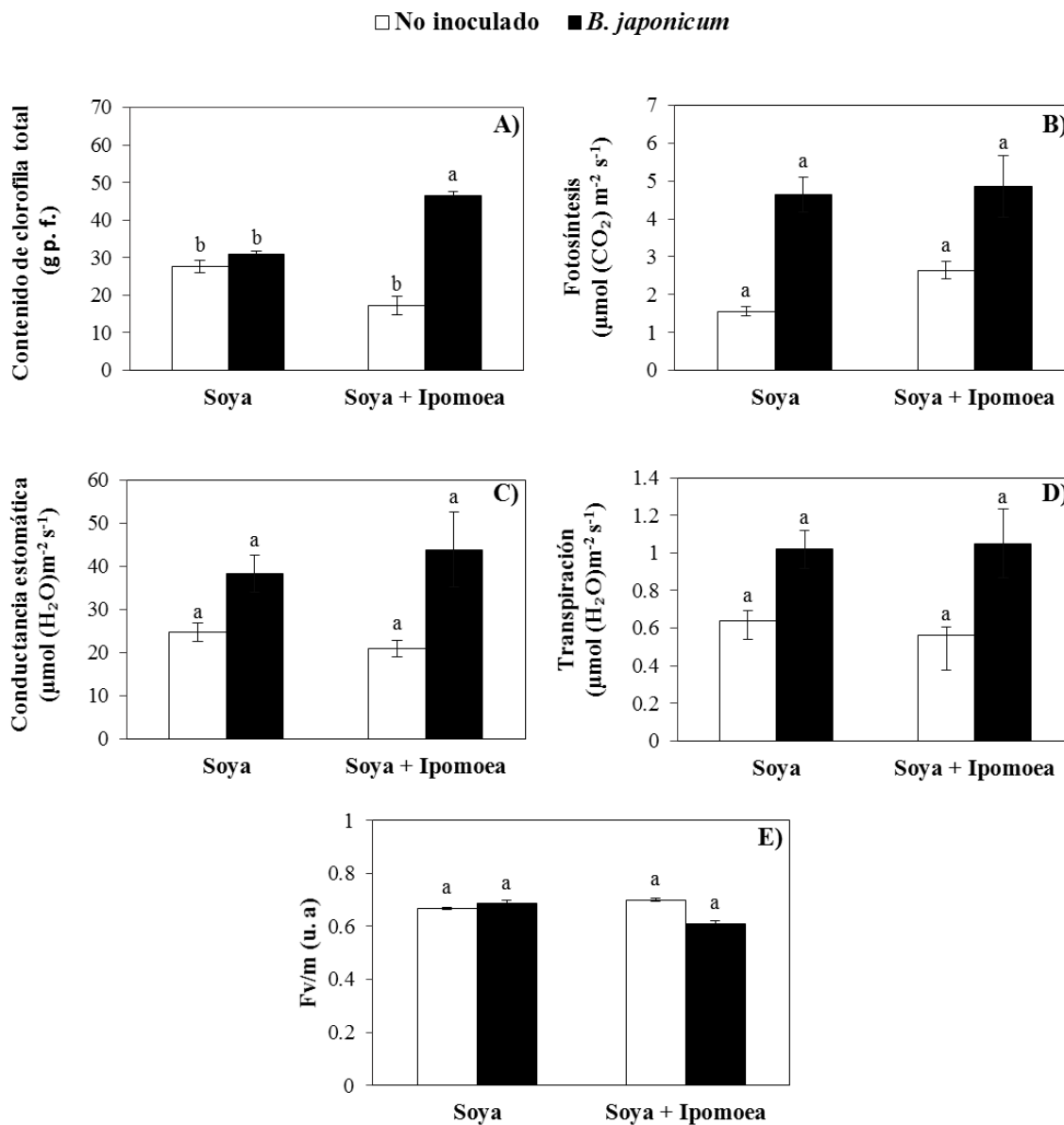


Figura 17. Efecto en las variables fisiológicas relacionadas con la concentración de clorofila total, intercambio gaseoso y eficiencia cuántica del PSII en plantas de soya, inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, en presencia de *Ipomoea purpurea*, después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado. Medias \pm error estándar con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

El mayor número de nódulos en las plantas de soya se encontró en presencia de *Ipomoea* y la inoculación con *B. japonicum* (Figura 18A), así también se registró un aumento significativo en la cantidad de etileno reducido (Figura 18C). En contraste con lo observado en las plantas de frijol, donde existió una afectación en la nodulación y actividad de la enzima nitrogenasa, es probable que *I. purpurea* ejerció un efecto estimulador en la simbiosis en plantas de soya.

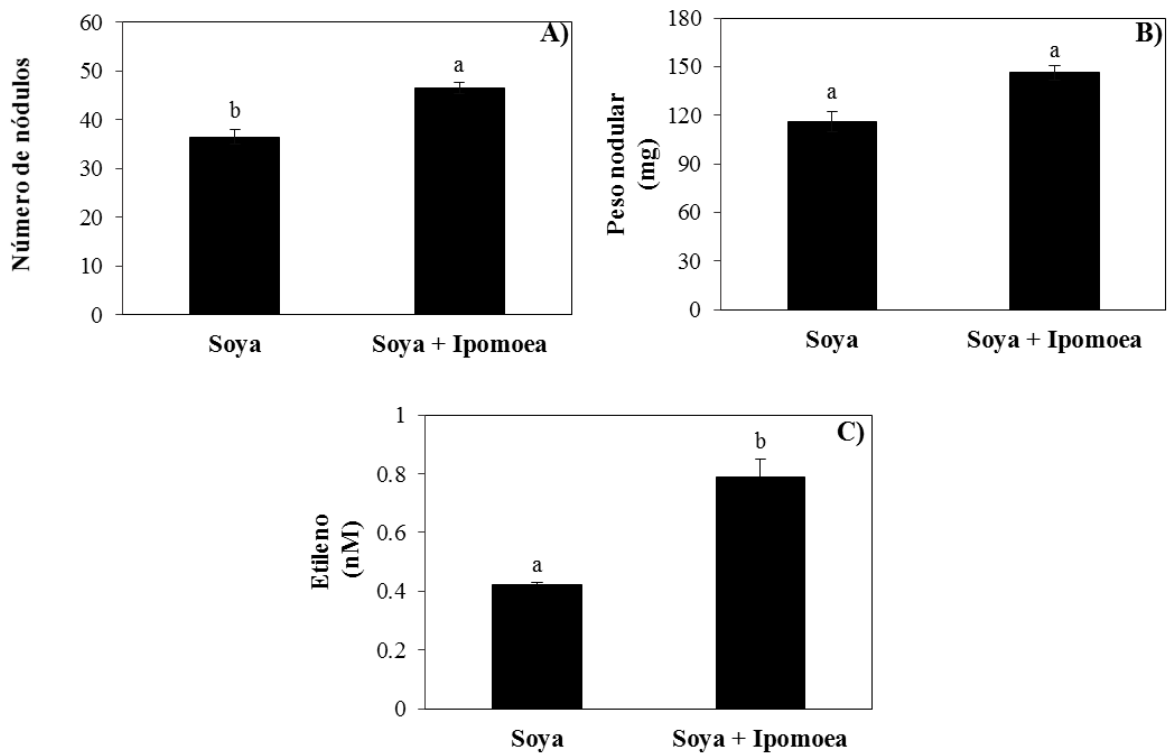


Figura 18. Número de nódulos (A), peso seco nodular (B) y cantidad de etileno reducido por acción de la enzima nitrogenasa (C) de plantas de soya inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 después de 35 días de crecimiento en cámara de ambiente controlado. Medias \pm error estándar con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P=0.05$).

FASE IV. Concentración y acumulación nutrimental (NPK) de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y soya (*Glycine max*) inoculadas con rizobios, en presencia de *Ipomoea purpurea*

6.5 Concentración nutrimental en la parte aérea de frijol y soya

La concentración de N en la parte aérea incrementó con la inoculación con *R. tropici* y *B. japonicum* en plantas de frijol y soya, respectivamente (Figuras 19A y 19D) en comparación con el testigo. Ante la presencia del factor *I. purpurea*, se tuvo un aumento significativo de la concentración de N en el vástago de frijol (Figura 15B). Por tanto en la interacción, la presencia de ambos factores (inoculación e *I. purpurea*) presentaron el mejor resultado de concentración de N en la parte aérea (Figura 19C).

La inoculación con su respectivo simbiote, también incrementó la concentración de P en la parte aérea en las plantas de frijol y soya en (Figuras 20A y 20D). Sin embargo, en presencia de *I. purpurea*, no se observó diferencia estadística (Figura 19E). En las interacciones, el tratamiento con ambos factores de estudio (Inoculación e *I. purpurea*) favoreció significativamente la concentración de P en frijol y soya (Figura 20CF).

La concentración de K aumentó al inocular con *B. japonicum* plantas de soya; por el contrario, la inoculación de plantas de frijol la redujo (Figuras 21A y 21D, respectivamente). La presencia de *I. purpurea* fue más eficiente, ya que incrementó la concentración de K en la parte aérea de la soya, no así en plantas de frijol (Figuras 21B y 21E). En la interacción de los factores, se corrobora el efecto benéfico de *I. purpurea* en la concentración de K en frijol (Figura 21C). En plantas de soya, el valor más alto se presentó en el tratamiento con ambos factores (Figura 21F).

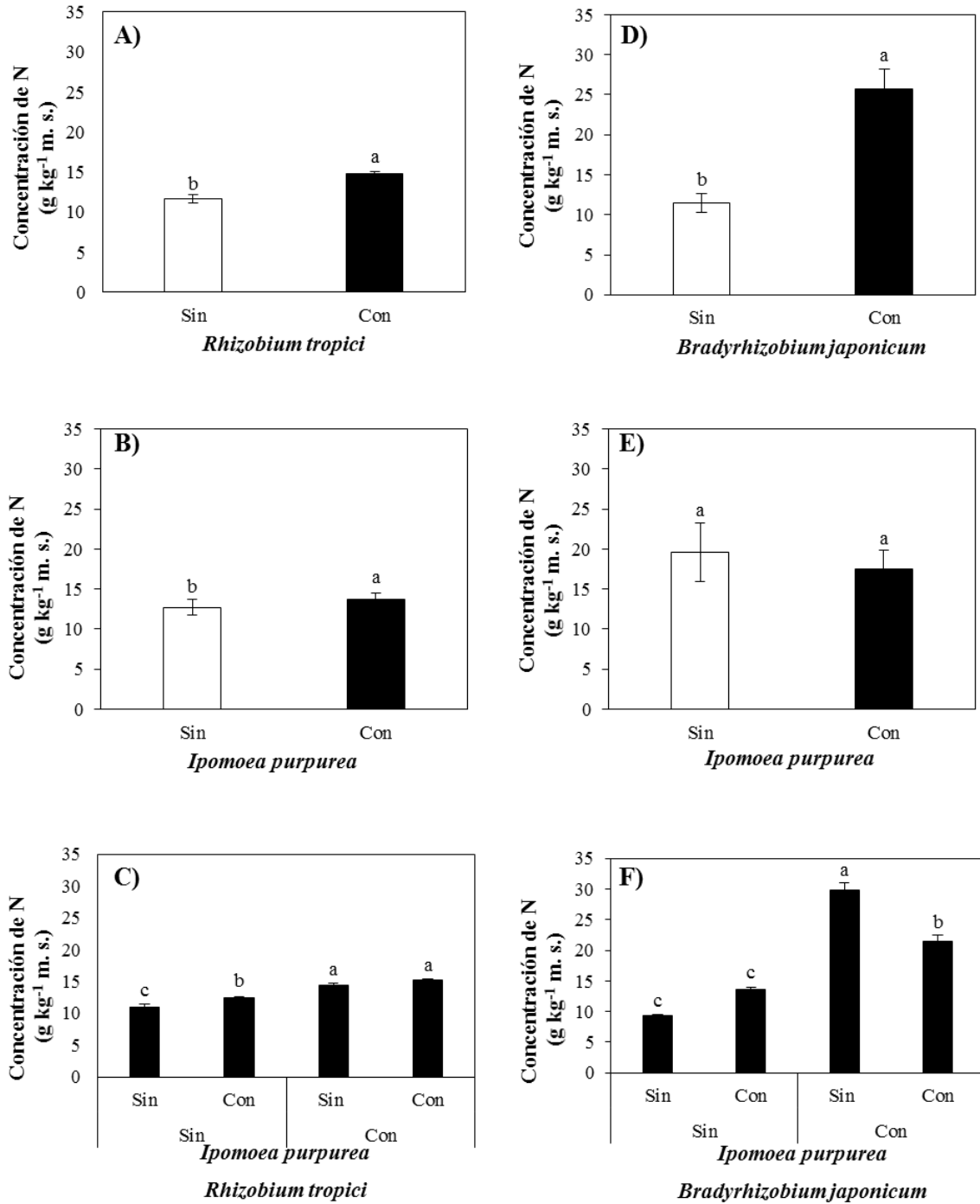


Figura 19. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de N en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soja var. Huasteca 100, respectivamente. Medias ± EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

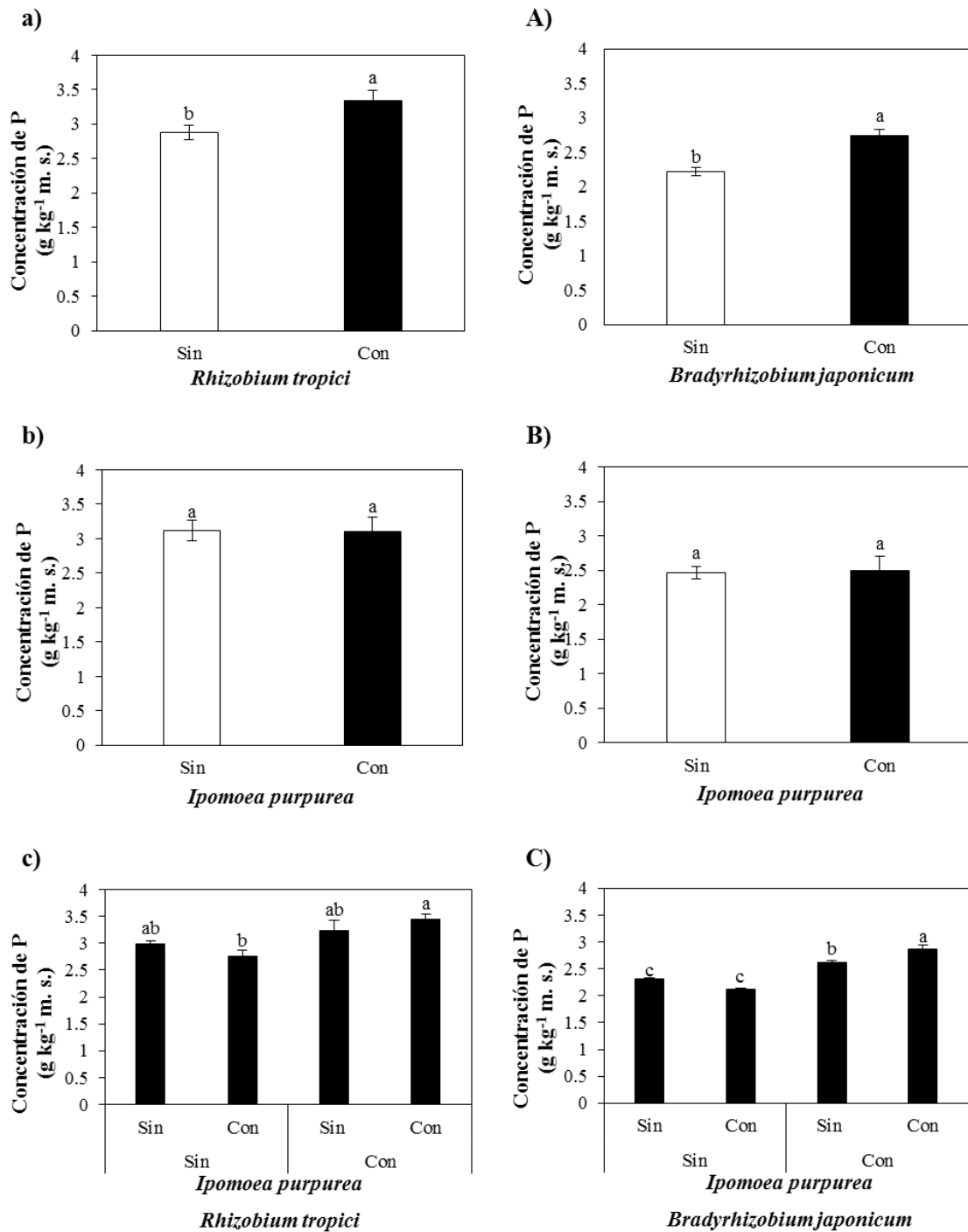


Figura 20. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de P en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias \pm EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

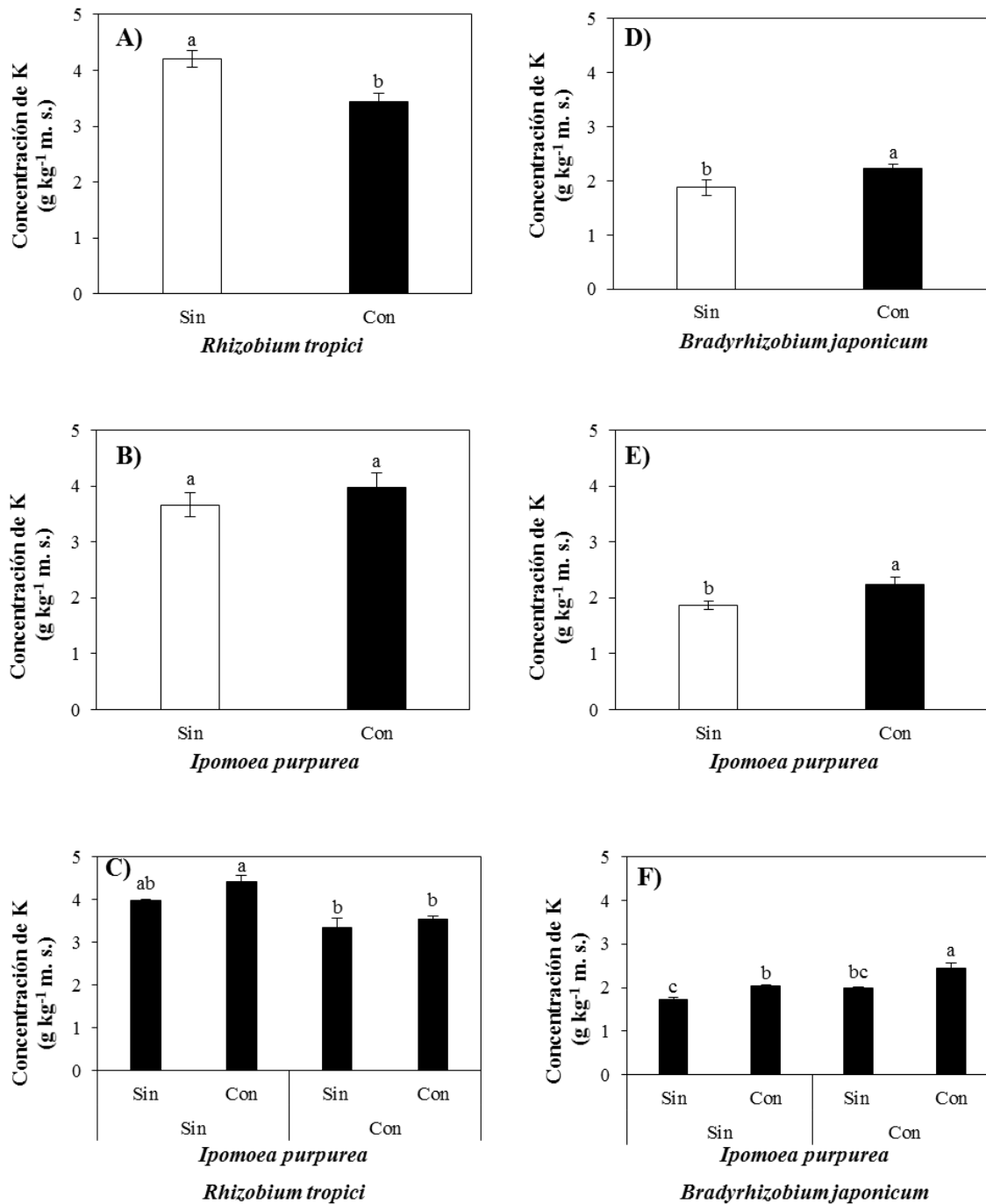


Figura 21. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de K en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias ± EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

6.6 Concentración nutrimental en la raíz de frijol y soya

En ambas leguminosas, la inoculación favoreció la concentración de N en la raíz, sin embargo solo fue significativo en las plantas de soya (Figuras 22A y 22D). Con *Ipomoea* presente, se observó lo contrario, solo aumentó significativamente la concentración de N en las plantas de frijol, pero no de soya (Figuras 22B y 22E). Lo anterior fue corroborado en la interacción de los factores, ya que en las plantas de frijol (Figura 22C) la presencia de ambos factores de estudio (inoculación e *I. purpurea*) ocasionó el aumento significativo de N; mientras que en soya, la inoculación con *B. japonicum* fue la más efectiva (Figura 22F).

Respecto a la concentración de P en la raíz de las plantas de frijol, la inoculación con *R. tropici* incrementó significativamente, pero en las plantas de soya se tuvo el efecto contrario, ya que la inoculación con *B. japonicum* disminuyó la concentración de P (Figuras 23A y 23D). La ausencia o presencia del factor *Ipomoea* no fue relevante en la concentración de P en ambas leguminosas (Figuras 23B y 23E). Mientras que con la interacción de los factores de estudio fue significativa en la concentración de P, al ser disminuida de manera significativa con el tratamiento con la incorporación de *I. purpurea* en plantas de frijol (Figura 23C); por el contrario, en soya incrementó la concentración de P en ausencia de ambos factores (Figura 23F).

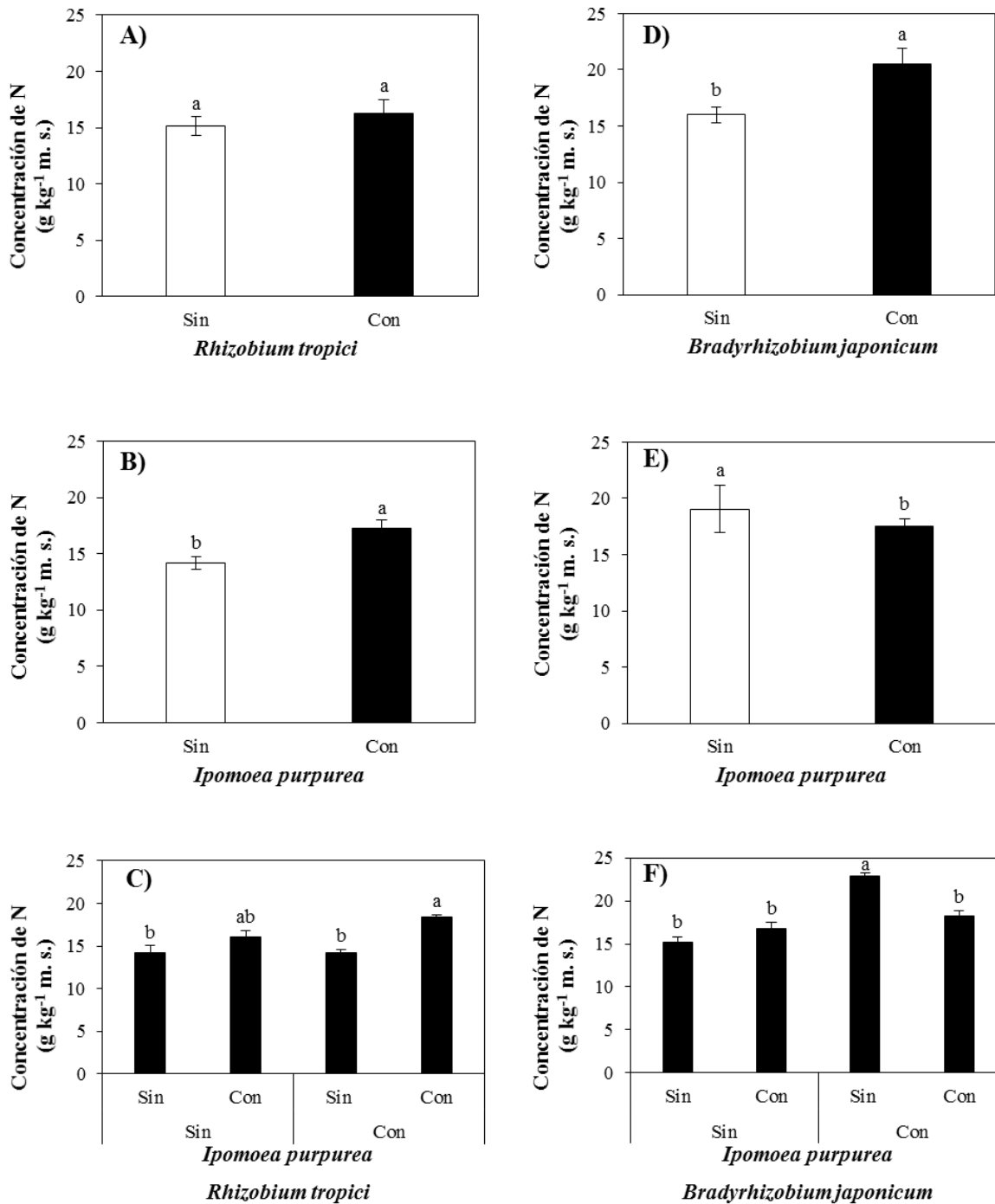


Figura 22. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de N en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias \pm EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

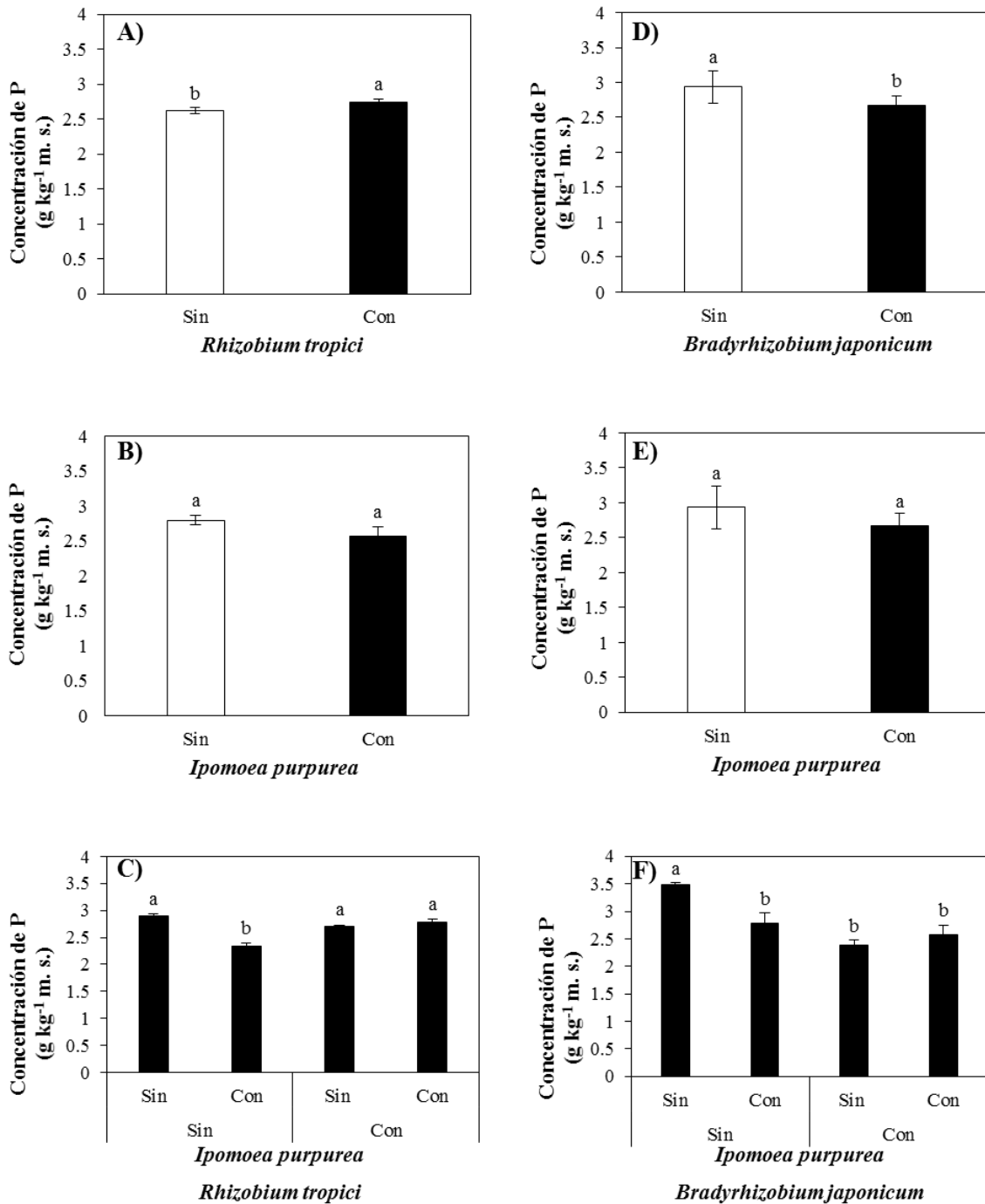


Figura 23. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de P en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias \pm EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En ausencia de la inoculación, las raíces de plantas de frijol y soya, se incrementaron las concentraciones de K (Figuras 24A y 24D). En presencia o ausencia de *I. purpurea* no se detectaron diferencias estadísticas significativas en la concentración de K en raíces de frijol y soya (Figuras 24B y 24E). De la misma manera, en la interacción de los factores el aumento de K en raíces de frijol (Figura 24C), pero en soya la falta de ambos factores la incrementó (Figura 24F).

6.7 Acumulación nutrimental en la parte aérea de frijol y soya

La acumulación de N en la parte aérea de la plantas de frijol y soya incrementó significativamente por la inoculación de *R. tropici* y *B. japonicum*, respectivamente (Figuras 25A y 25D). La presencia del factor *Ipomoea* redujo significativamente la acumulación de N en ambas leguminosas (Figuras 25B y 25E). En la interacción de ambos factores, la inoculación con *R. tropici* no fue significativa en la acumulación de N en en la parte aérea de frijol, mientras que la inoculación con *B. japonicum* aumentó significativamente la acumulación de N en soya (Figura 25F).

La acumulación de fósforo (P) de la parte aérea de frijol incrementó por la inoculación de *R. tropici*, no así, en la soya (Figuras 26A y 26D). Cuando *I. purpurea* estuvo presente los niveles de P disminuyeron considerablemente en ambas leguminosas (Figura 26BE). En la interacción de los factores, incrementa el P ante la inoculación en plantas de frijol y disminuye en presencia de *I. purpurea* (Figura 26C). En soya, la acumulación más alta de P se observó en ausencia de los factores, y la más baja con la incorporación de *I. purpurea* (Figura 26F).

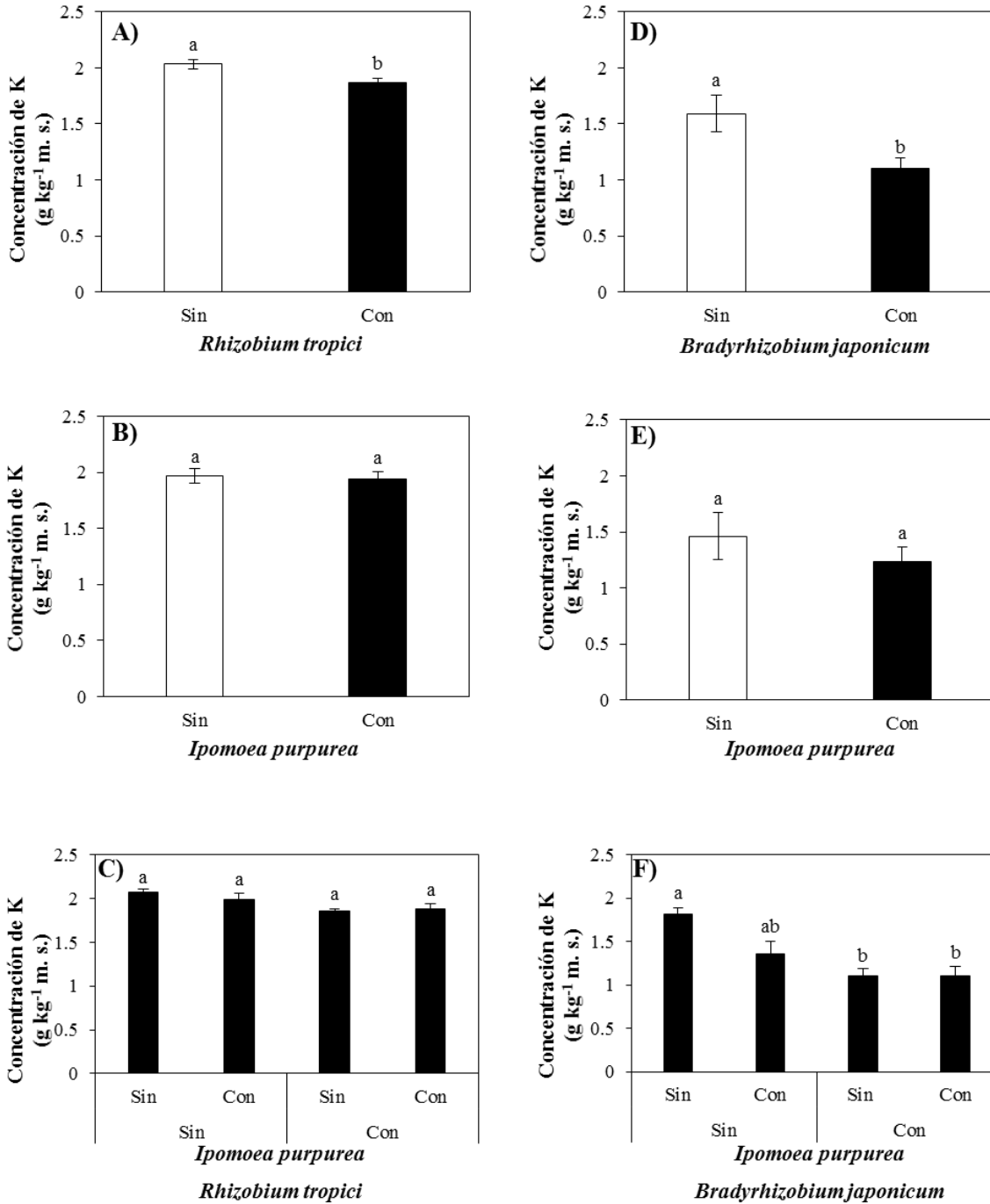


Figura 24. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la concentración de K en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias ± EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

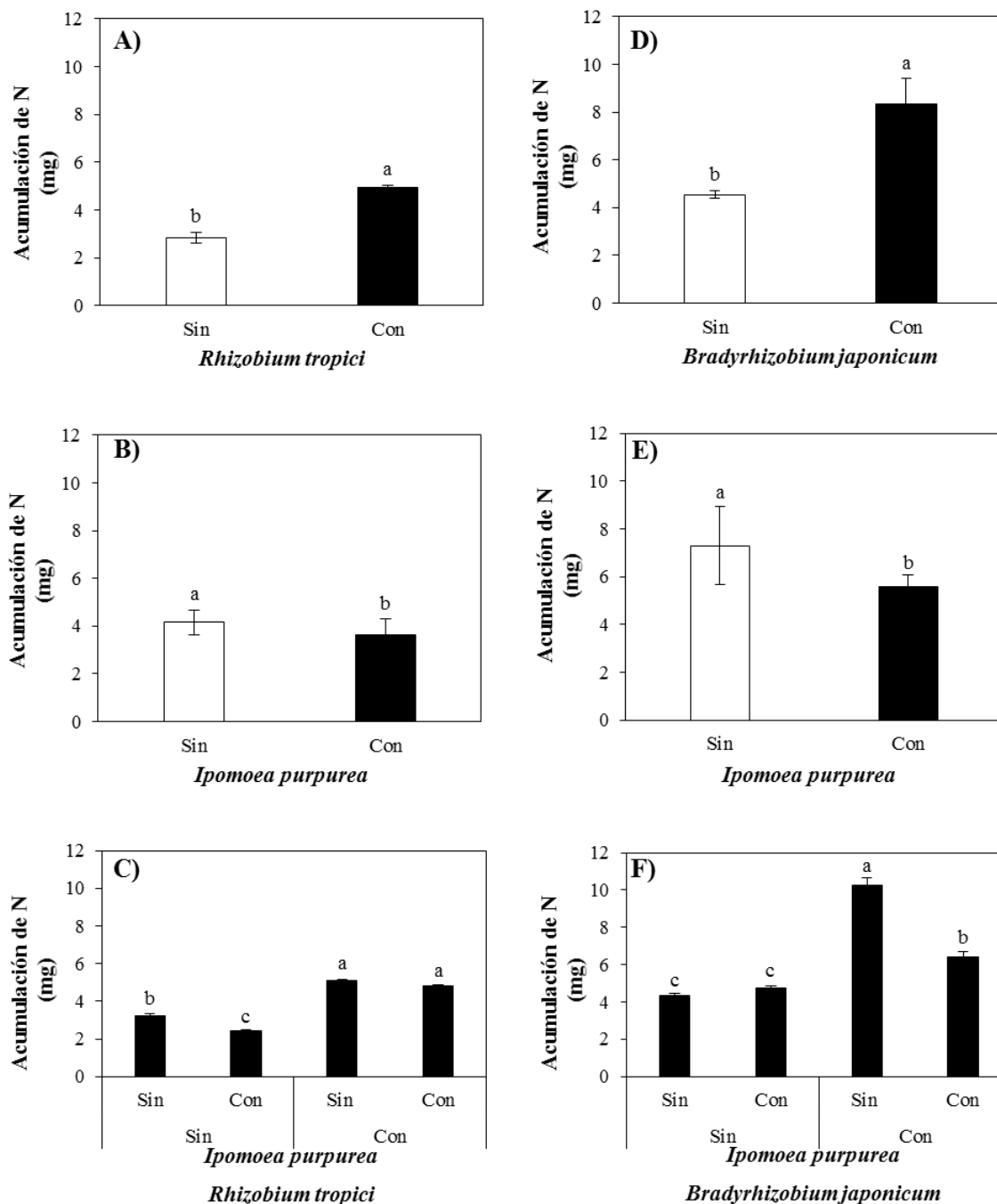


Figura 25. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de N en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias \pm EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

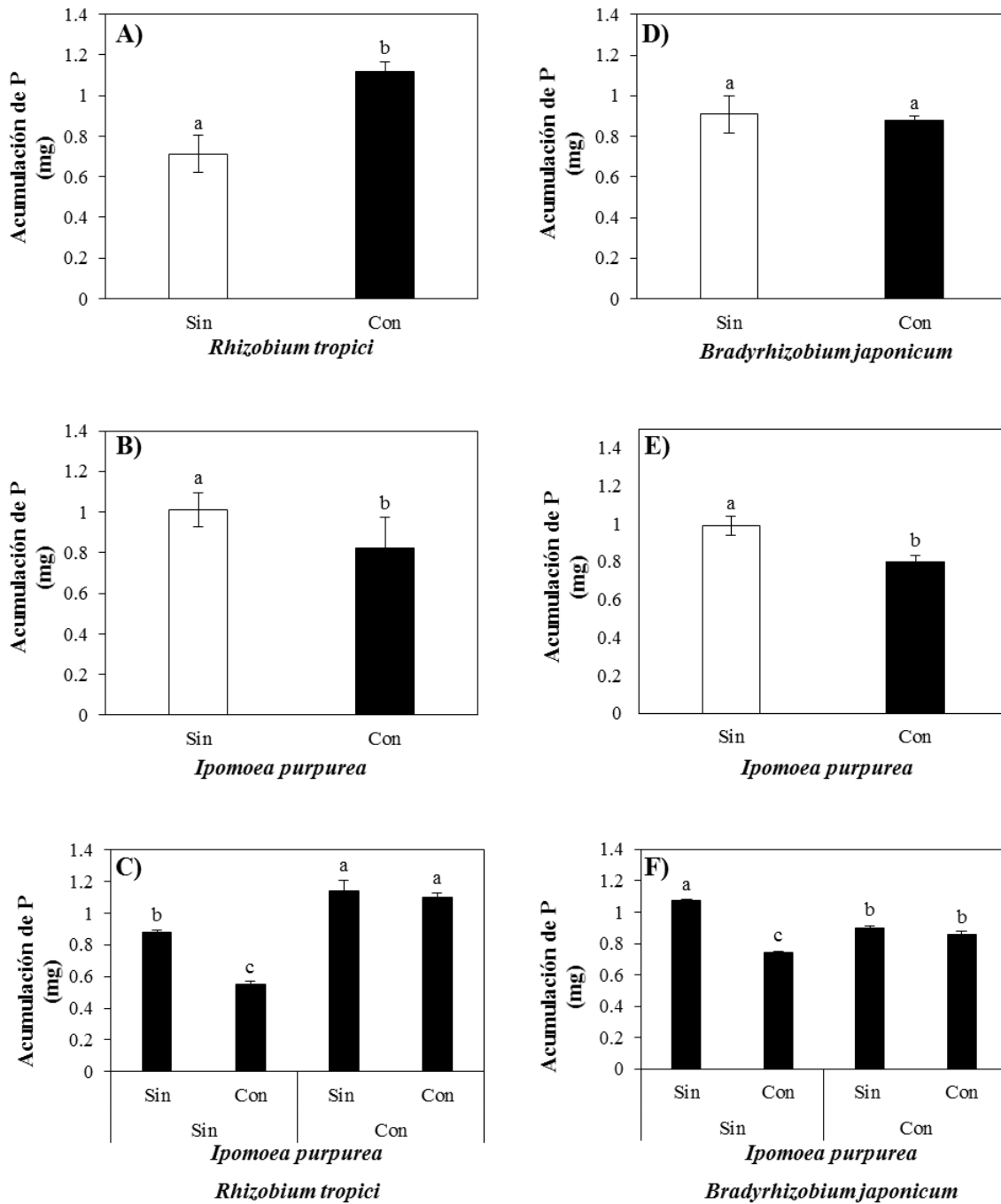


Figura 26. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de P en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soja var. Huasteca 100, respectivamente. Medias \pm EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Tanto la inoculación, así como la presencia de *I. purpurea* no fueron importantes en la acumulación de K en la parte aérea de soya (Figuras 27D, 27E y 27F); en frijol, su acumulación aumentó significativamente con la inoculación de *R. tropici* (Figura 27A). Mientras que en ausencia de *I. purpurea* la acumulación de K aumentó significativamente en las plantas de frijol (Figura 27B). La relevancia de ambos factores queda corroborada en la interacción de éstos, ya que la inoculación incrementó y la planta alelopática disminuyó significativamente la acumulación de K en las plantas de frijol (Figura 27C).

6.8 Acumulación nutrimental en la raíz de frijol y soya

La inoculación con *R. tropici* y *B. japonicum* incrementó significativamente la acumulación de N en la raíz de frijol y soya respectivamente (Figuras 28A y 28D). Así mismo, *I. purpurea* favoreció la acumulación de N en frijol (Figura 28B), aunque en soya las medias fueron estadísticamente similares (Figuras 28B y 28E). Por lo anterior, en la interacción de factores, existió el aumento significativo de N en frijol (Figura 28C) y en soya, resultó mejor la inoculación con *B. japonicum* (Figura 28F).

La acumulación de P en la raíz de frijol incrementó en el tratamiento inoculado (Figura 29A). Por el contrario, en soya, la inoculación redujo significativamente su acumulación (Figura 29D). Con el factor *Ipomoea*, no fueron significativos los resultados en ambas leguminosas (Figuras 29B y 29E). Mientras que en la interacción, el tratamiento con ambos factores obtuvo el valor más alto en frijol y el más bajo se presentó con *I. purpurea* (Figura 29C); mientras que en la raíz de soya, el tratamiento inoculado presentó la menor acumulación de P (Figura 29F).

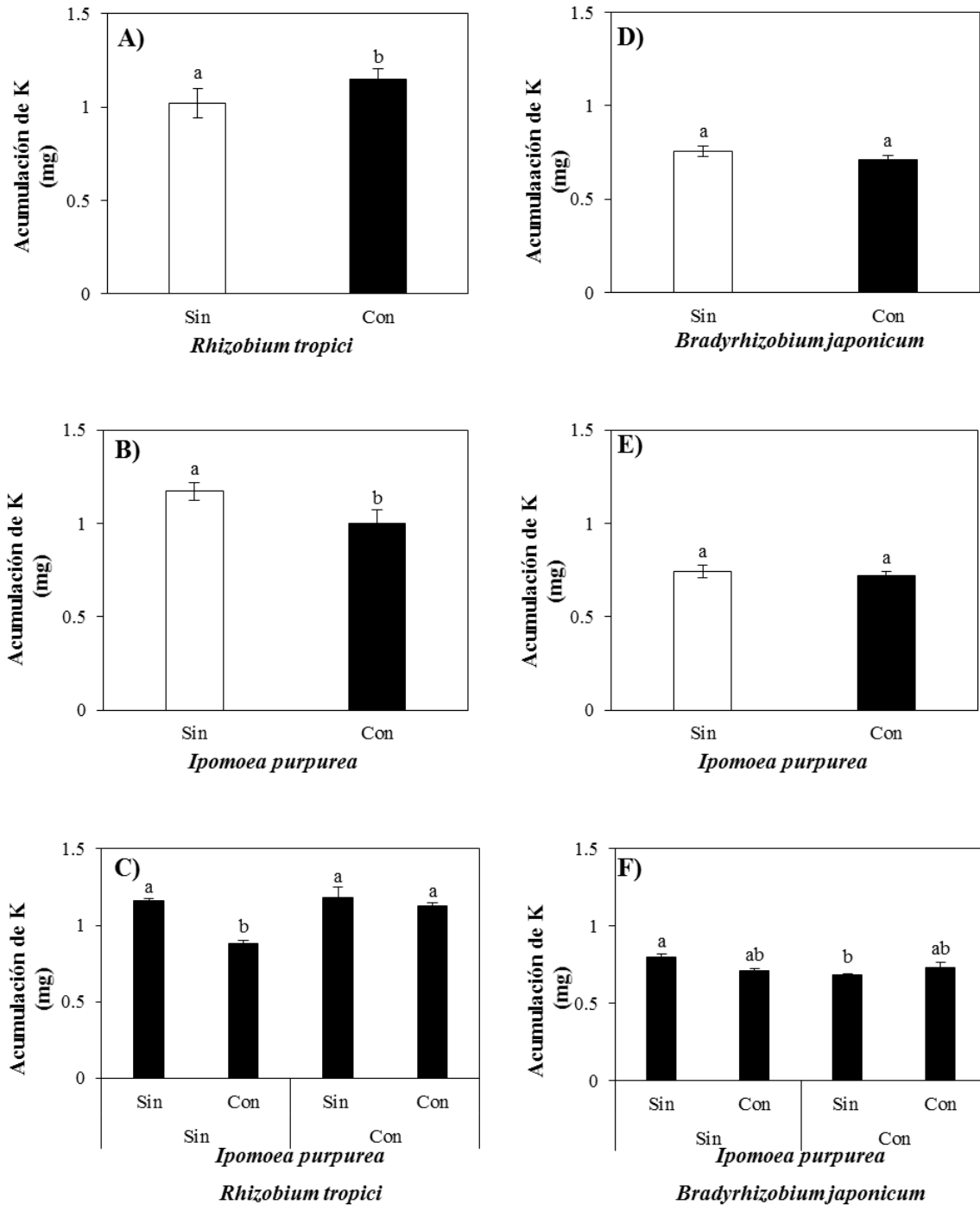


Figura 27. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de K en la parte aérea de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias \pm EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

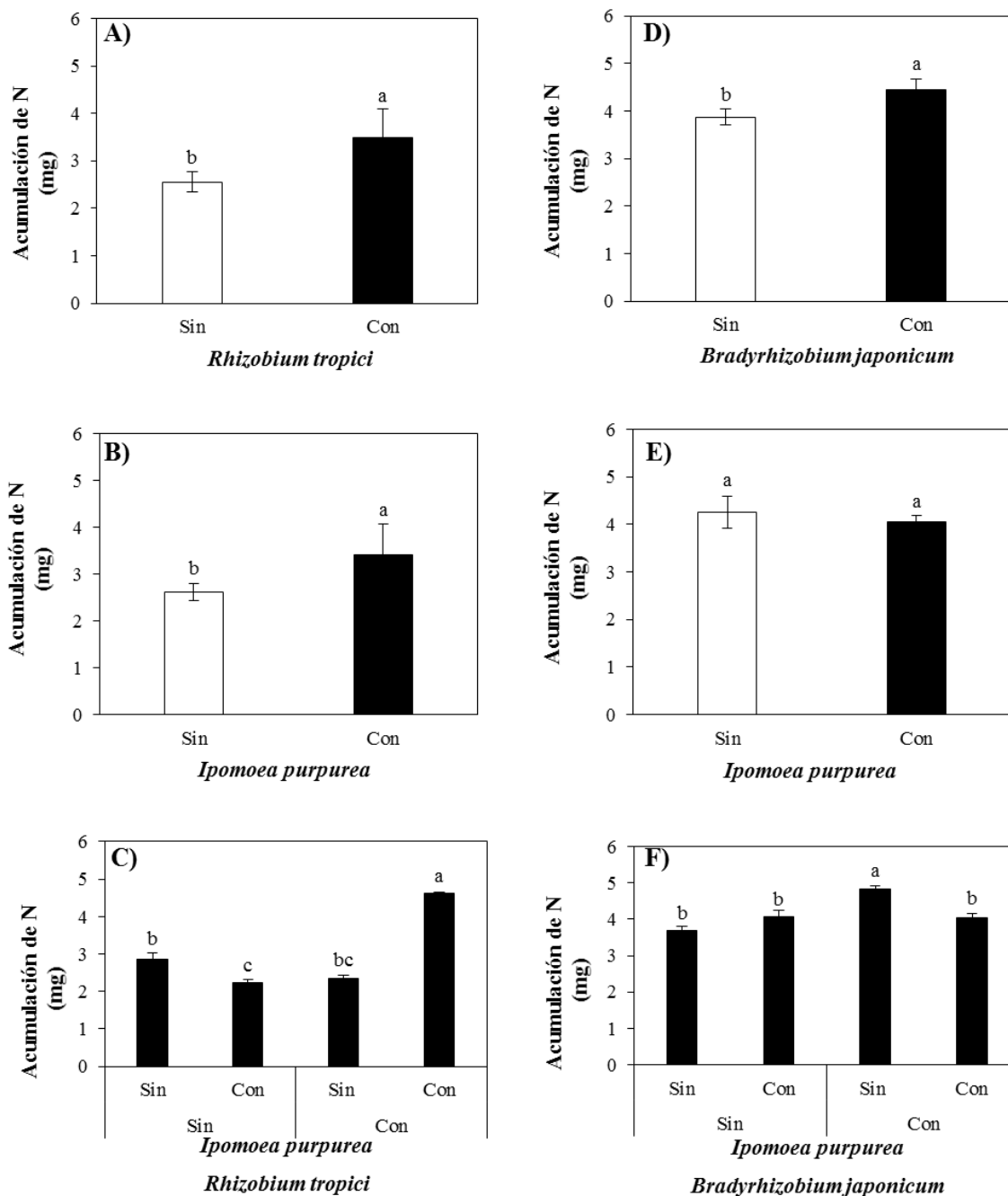


Figura 28. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de N en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias \pm EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

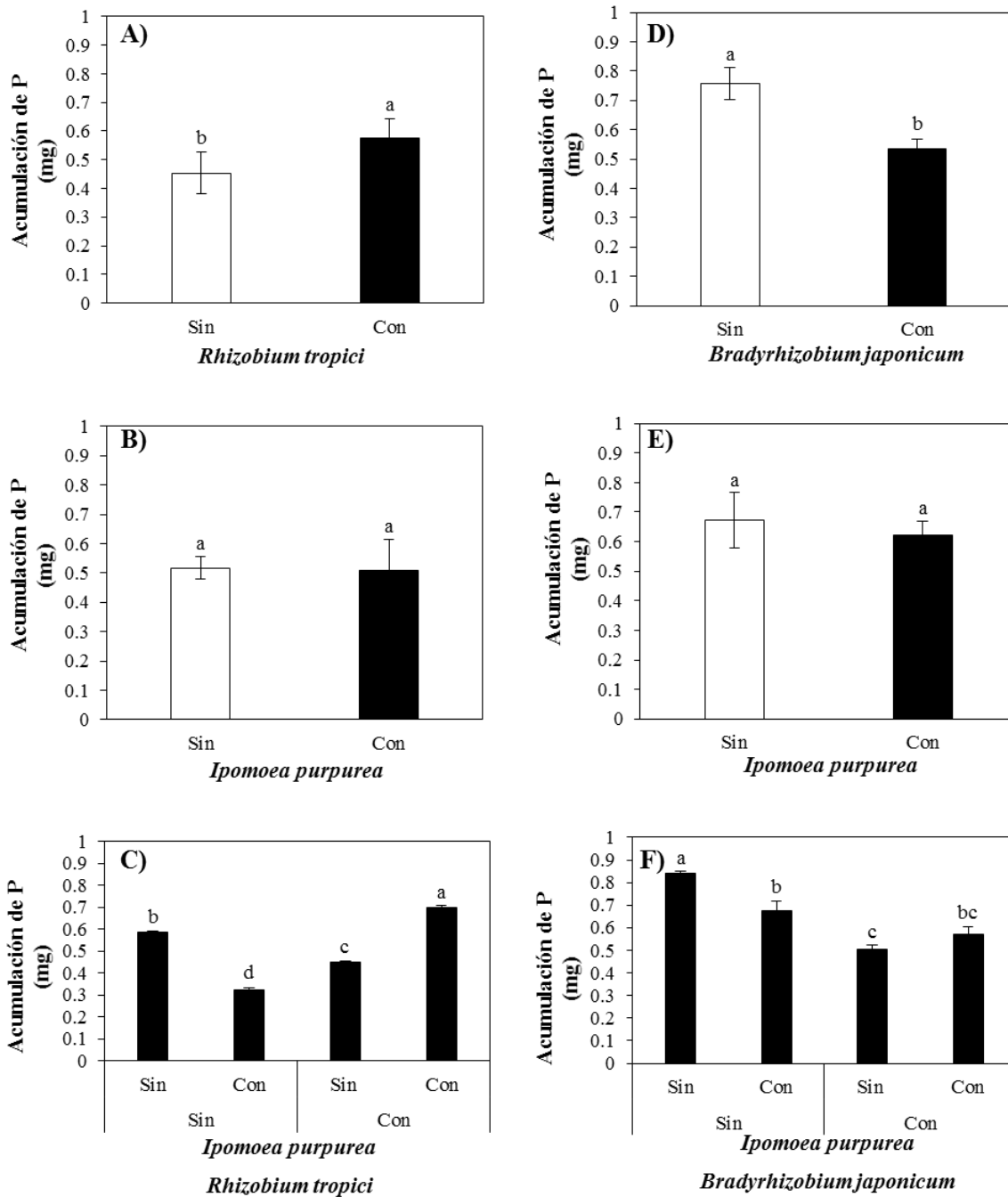


Figura 29. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de P en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias \pm EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En la raíz de frijol, la acumulación de K aumentó en el tratamiento inoculado con *R. tropici* (Figura 30A), no así en soya con la inoculación de *B. japonicum* (Figura 30D). Aunque por si solo el factor *Ipomoea* no generó una diferencia significativa en ambas leguminosas (Figura 30BE), en la interacción de los factores, la presencia de ambos aumentó significativamente la acumulación de K en la raíz de frijol (Figura 30C). Por lo anterior, en la interacción de la inoculación e *I. purpurea* el resultado favoreció la acumulación de K en la raíz de frijol (Figura 30C). Por el contrario, el valor más alto de acumulación de K en la raíz de soya fue en ausencia de ambos factores (Figura 30F).

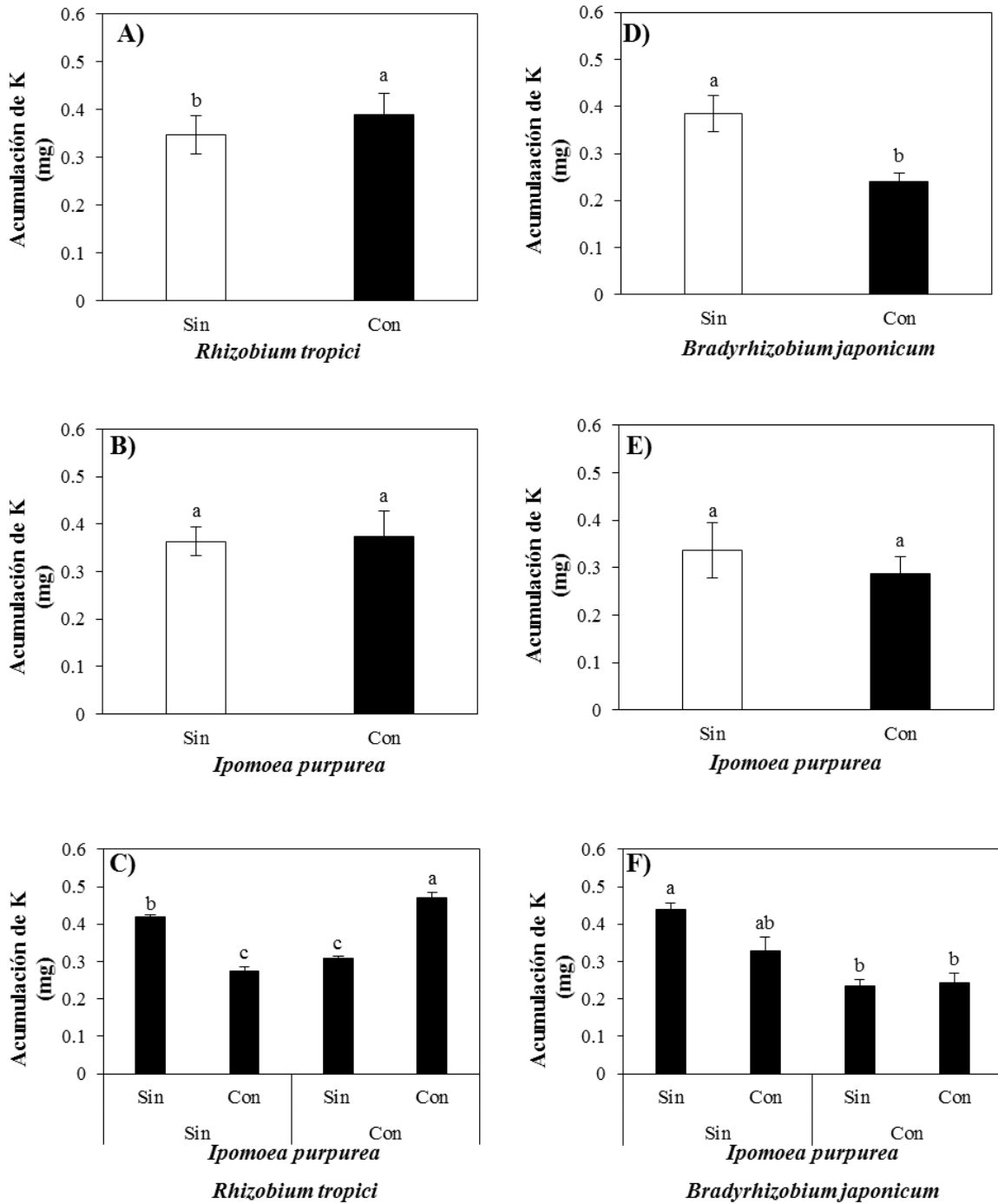


Figura 30. Efectos principales de *Rhizobium tropici* (A), *Bradyrhizobium japonicum* (D), de *Ipomoea purpurea* (B, E) y de su interacción (C, F), en la acumulación de K en la raíz de plantas de frijol var. Flor de Mayo y soya var. Huasteca 100, respectivamente. Medias \pm EE en cada subfigura con letras distintas se indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

VII. DISCUSIÓN

FASE I. Bioensayo con los lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* en la germinación y longitud radical de frijol y soya

La estimulación que ocasionó el lixiviado acuoso radical de *Ipomoea* en la germinación de semillas de frijol contrasta con lo observado por Torres-García *et al.* (2006), quienes reportan la inhibición de la germinación de semillas de frijol al aplicar un extracto acuoso de *I. batatas* (L.). De manera similar, el extracto acuoso foliar de *I. cairica* tuvo efectos negativos en el porcentaje de germinación de *Bidens pilosa*, *Echinochloa crus-galli*, *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia* (Takao *et al.*, 2011). Otras investigaciones indican que la aplicación de extractos de *Guadua angustifolia*, *Bambusa vulgaris* y *Dendrocalamus strictus* no tuvo efectos en la germinación de semillas de frijol (Rios y Rosabal, 2008). Los extractos de plantas alelopáticas están asociados con efectos negativos en diversas plantas; sin embargo, algunos efectos benéficos o estimulantes pueden ser obtenidos, tal como ocurrió en el presente trabajo con la germinación de semillas de frijol ante extractos de raíz o de la parte aérea, a las 48 h de tratamiento.

La ausencia de cualquier efecto alelopático en la germinación y longitud radical en semillas de soya es corroborada por Torres-García *et al.* (2006) quienes también han reportado efectos nulos en la germinación de las semillas de soya frente al extracto de *Ipomoea batatas*. En general, los lixiviados acuosos de la raíz producen efectos estimularios, no obstante, en la literatura sobresalen los efectos inhibitorios en la soya, por ejemplo, Bhatt *et al.* (1994) registraron la disminución de la germinación de soya hasta en

50%, aproximadamente, frente a extractos acuosos de *Crotalaria alata*, *C. medicaginea*, *Parthenium hysterophorus* y *Xanthium stramonium*.

Las leguminosas *Centrosema pubescens*, *Calopogonium mucunoides*, y *Stylosanthes guianensis* inoculadas con *B. japonicum*, presentaron una respuesta similar a la de soya frente al lixiviado acuoso de la parte aérea de *Ipomoea*, ya que existió una inhibición de la germinación frente a los extractos acuosos de las gramíneas *Bachiaria decumbens*, *B. humidicola* y *B. brizanta* (Pimentel *et al.*, 1997). Asimismo, el porcentaje de germinación de las leguminosas *Arachis hipogea* y *Vigna radiata* disminuyó en presencia de residuos de *Eclipta alba* L. (Gulzar y Siddiqui, 2015). Por lo anterior,

FASE II. Efecto de los lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* en el crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici* CIAT899 y *B. japonicum* USDA110

El estudio de los efectos de plantas alelopáticas en microorganismos benéficos de vida libre o simbióticos ha sido limitado. Dawson y Seymour (1983) indican que la aplicación de juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) en concentraciones bajas (0.001 y 0.0001 M), afectó significativamente el crecimiento *in vitro* de *B. japonicum* 71; estas concentraciones de juglona pueden estar en la solución del suelo y por lo tanto inhibir su simbiosis con leguminosas.

El presente trabajo corrobora la inhibición que tuvo el lixiviado acuoso de la raíz y de la parte aérea de *I. purpurea* en el crecimiento *in vitro* de *R. tropici* CIAT899, dicha inhibición fue del 11.37 y 11.81% en promedio, respectivamente. No obstante, Alford *et al.* (2009) demostraron que el crecimiento *in vitro* de cuatro cepas silvestres de rizobios

(Rm1021, USDA 3174, USDA 4882, y WU425) puede ser favorecido por compuestos (benzoflavona y (\pm)-catequina) presentes en los extractos de *Acroptilon repens* (Asteraceae) y *Centaurea maculosa* (Asteraceae). La planta *I. purpurea* puede ser una fuente de aleloquímicos que potencialmente serían liberados por la raíz y bien por efecto de mineralización de hojas en el suelo, con ello provocar efectos negativos (Fernández *et al.*, 2016), como fue el caso de la inhibición del crecimiento vegetativo de las plantas de frijol observada en el presente trabajo.

FASE III. Crecimiento y respuesta fisiológica de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* L. Merr.) inoculadas con rizobios en presencia de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth

La inoculación de bacterias del tipo de los rizobios provee beneficios a través de la fijación de nitrógeno que mejoran el crecimiento y el desarrollo de leguminosas (Granda Mora *et al.*, 2016), lo cual se corrobora con los efectos benéficos obtenidos por la inoculación de *R. tropici* en plantas de frijol. La presencia de *Ipomoea* produjo efectos negativos en el crecimiento de *P. vulgaris*, con o sin, la inoculación de *R. tropici*; sin embargo, esta bacteria simbiótica atenuó la inhibición del crecimiento vegetal provocada por *Ipomoea*.

Los compuestos aleloquímicos derivados de plantas alelopáticas reducen parámetros del crecimiento como el área foliar de las plantas receptoras (Zhou y Yu, 2006). Por ejemplo, El-Khatib *et al.* (2016) demostraron que el extracto acuoso foliar de *Caloropis procera* (Apocynaceae) redujo el peso seco y el área foliar del pepino, trigo y tomate,

conforme aumentó la concentración. Lo anterior se relaciona con el efecto negativo que tuvo *Ipomoea* en altura, volumen radical y peso seco total de las plantas de frijol; sin embargo, ni el diámetro de tallo ni el área foliar no fueron afectados de manera significativa por la aplicación de los lixiviados de raíz y de la parte aérea de esta planta.

Respecto al crecimiento de soya, la respuesta poco favorable en variables como altura, volumen radical, biomasa seca, pueden deberse a la ineficiencia de la fijación de nitrógeno, la cual es dependiente de los procesos fisiológicos de la planta así como de la bacteria, la interacción de ambos, y factores abióticos (temperatura, humedad relativa, disponibilidad de agua y nutrientes) que limitan el funcionamiento de la planta y la actividad nodular (Aranjuelo *et al.* 2014; Heath, 2010; Sanz-Saez *et al.*, 2015). Aunque la presencia de *Ipomoea* únicamente inhibió de manera significativa el área foliar, Mallik y Tesfai (1988) indicaron que la incorporación de los residuos (1%) de *Chenopodium album* también redujeron la biomasa aérea y radical de la soya en un 60 y 40%, respectivamente. Por lo anterior, también se considera que la presencia de *I. purpurea* interfirió en el tratamiento inoculado con *B. japonicum*, ya que se observó una disminución en altura, volumen radical y biomasa seca total en comparación con las plantas de soya exclusivamente inoculadas.

Aunque no fue significativa la disminución de la concentración de clorofila total en las plantas de frijol por la presencia de *Ipomoea*, se conoce que los compuestos derivados de plantas alelopáticas reducen la acumulación de clorofila de las plantas receptoras (Zhou y Yu, 2006; Zhu *et al.* (2017). Al respecto, Portales-Reyes *et al.* (2015) reportaron que los compuestos isotiocianato (AITC) y bencilisotiocianato (BITC) disminuyeron el contenido de clorofila en la leguminosa *Amphicarpa bracteata*. Sin embargo, la mejoría fisiológica

observada en las plantas de soya inoculadas con *B. japonicum* contrasta con lo observado en las plantas de frijol. Por lo anterior, es probable que *B. japonicum* mitigue o incluso mejore la respuesta fisiológica de la soya ante la presencia de una planta alelopática como *I. purpurea*.

Los compuestos aleloquímicos pueden afectar el rendimiento de la fotosíntesis a través de la alteración de procesos importantes como el suministro de CO₂ a través de los estomas, el transporte de electrones y el ciclo de reducción del carbono, sin embargo los mecanismos en los que intervienen los aleloquímicos son poco claros (Zhou y Yu, 2006). Al respecto, Lorenzo *et al.* (2011) comprobaron que los lixiviados acuosos de *Acacia dealbata* disminuyeron la tasa neta de fotosíntesis de *Hedera hibernica*, *Dicranum* sp. *Dactylis glomerata* y *Leucobryum* sp. Por lo anterior, *Ipomoea purpurea* es una fuente potencial de aleloquímicos afectan la fotosíntesis, ya que su presencia en el tratamiento inoculado disminuyó los valores, con respecto a las plantas de frijol inoculado.

Los compuestos alelopáticos con frecuencia reducen la conductancia estomática de las plantas vecinas (Zhou y Yu, 2006). Lo anterior se vincula a lo observado en las plantas de frijol inoculadas, ya que a pesar de tener los valores más altos, cuando fue añadida *I. purpurea* se redujo la respuesta. Zhu *et al.* (2017) indicaron que los extractos acuoso y etanólico de la corteza de la raíz de *Prunus persica* redujeron significativamente la conductancia estomática del mismo melocotón.

La transpiración como un proceso que involucra la pérdida de agua en forma de vapor a través de la parte aérea de la planta (Hopkins y Huner, 2008) es una variable que puede ser afectada por compuestos alelopáticos. Marchiosi *et al.* (2016) indicaron la disminución drástica de la tasa de fotosíntesis y la transpiración cuando la soya fue

expuesta al compuesto L-DOPA (L-3,4-Dihidroxifenilalanina) presente en *Mucuna pruriens*. De manera similar, los resultados de este estudio corroboran el efecto negativo de *I. purpurea* en las plantas de frijol, especialmente las inoculadas, debido a la reducción de la transpiración que fue disminuida significativamente. Mishra (2015) indica la relación inversamente proporcional de la disminución de la transpiración y el aumento de la concentración del extracto acuoso de hojas de *Lantana camara* aplicado a plantas de *Ficus religiosa*, *F. benghalensis* y *Syzygium cumini*.

La alta sensibilidad del fotosistema II a la influencia de los factores bióticos y abióticos hace de la medición de la fluorescencia de la clorofila (α) un parámetro que permite conocer la respuesta de las plantas a los cambios ambientales (Kalaji *et al.*, 2016; Murchie y Lawson, 2013). La exposición a exudados de la raíz de ciertas plantas como *Bidens pilosa* o la aplicación de compuestos alelopáticos que son abundantes en el suelo como el ácido cinámico y ácido p-hidrobenczoico (1.5 mM) reducen la eficiencia cuántica del centro de reacción del PSII de *Pteris multifida*, *Lactuca sativa* y *Dactylis glomerata* (Hussain y Reigosa, 2011a y b; Hussain *et al.*, 2015; Zhang, *et al.*, 2016). Sin embargo, no siempre el efecto negativo es significativo, por ejemplo, Marchiosi *et al.* (2016) indicaron que la exposición al extracto acuoso de *Mucuna pruriens* generó la disminución en la fotosíntesis y la conductancia estomática, pero ningún cambio se observó en la relación Fv/Fm. Lo anterior coincide con el presente estudio, ya que la eficiencia cuántica del centro de reacción del PSII en las plantas de frijol y soya no fueron diferenciales ante la presencia de *Ipomoea*. Debido a que la clorofila juega un papel importante en la absorción, transferencia y transformación de la energía luminosa es necesaria una mayor indagación sobre la influencia de las plantas alelopáticas en este parámetro.

Ciertos compuestos aleloquímicos son importantes en el establecimiento de la comunicación rizobio-leguminosa (Janczarek *et al.*, 2015), pero algunos otros compuestos presentes en los extractos de plantas alelopáticas pueden ejercer un efecto inhibitorio en la producción de nódulos en leguminosas como *Amphicarpaea bracteata*, *Cicer arietinum* y *Pisum sativum* (Portales-Reyes *et al.*, 2015; Batish *et al.*, 2007). Lo anterior se demuestra con la respuesta inhibitoria presentada en el número de nódulos formados por la inoculación con *R. tropici* en las plantas de frijol bajo la influencia de *Ipomoea*.

En contraste con lo observado en las plantas de frijol, donde existió una afectación en la nodulación y actividad de la enzima nitrogenasa, es probable que *Ipomoea* ejerció un efecto estimulador en la simbiosis con plantas de soya. Al respecto, Mallik y Tesfai (1987) señalaron la estimulación de hasta el 34% en el crecimiento de *B. japonicum* frente a los extractos acuosos de *Setaria viridis*, *Chenopodium album*, *Shorgum halepense* y *Polygonum pensylvanicum*. Por el contrario, Heckman y Kluchinski (1995) reportaron la ausencia de efectos negativos en la nodulación de soya bajo los efectos de los residuos foliares del nogal rojo (*Quercus rubra*), el arce azucarero (*Acer saccharum*), *Platanus occidentalis*, nogal negro (*Juglans nigra*), centeno (*Secale cereale*) y la paja de maíz (*Zea mays*), ya que aumentaron al 40% la nodulación.

Es probable que los aleloquímicos exudados de *I. purpurea* hayan estimulado la simbiosis en plantas de soya, a través de la producción de compuestos químicos como los flavonoides, los cuales son esenciales en el establecimiento de la comunicación y desarrollo de la simbiosis rizobio-leguminosa (Gage, 2004; Miransari, 2014). Sin embargo, es necesaria una mayor investigación al respecto.

FASE IV. Concentración y acumulación nutrimental (NPK) de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y soya (*Glycine max*) inoculadas con rizobios, en presencia de *Ipomoea purpurea*

Concentración nutrimental en la parte aérea y raíz de frijol y soya

El nitrógeno (N) es un componente importante de todas las proteínas y ácidos nucleicos y que está presente en coenzimas, nucleótidos, amidas, ureidos y en la clorofila entre otros (Alcántar *et al.*, 2012). La interacción benéfica de ambos factores (inoculación e *Ipomoea*) en la concentración de N, principalmente en la parte aérea de frijol, contrasta con lo reportado por Michelsen *et al.* (1995) quienes demostraron que el extracto de *Betula tortuosa* disminuyó la concentración de N de la parte aérea y de la raíz de *Carex bigelowii*, así como el N de la parte aérea en *Festuca vivipara*.

La alta concentración de P en la parte aérea de ambas leguminosas, sugiere que hubo una mejor actividad metabólica relacionada con la transferencia de energía, además de considerarse el P un elemento constituyente de ácidos nucleicos y participar en la síntesis de proteínas (Alcántar *et al.*, 2012).

Aunque el potasio (K) es un elemento importante en los procesos como el equilibrio iónico y la regularización osmótica, en la interacción de ambos factores que incrementó la concentración de K en la parte aérea de soya y en presencia de *I. purpurea* en frijol, coincide con el aumento de K en plantas de maíz observado bajo la aplicación residual de *Medicago sativa*, aunque el N y P disminuyeron conforme aumentó la concentración de dicho residuo (Ahmed *et al.*, 2014).

Aunque son deficientes los reportes de concentración nutrimental en la raíz de las plantas receptoras de compuestos alelopáticos, y debido a la afectación general de la

concentración de N, P y K ante la presencia de *I. purpurea*, es probable que *I. purpurea*, haya generado el mismo efecto que reportan Muturi *et al.* (2017), debido a que los residuos foliares de *Acacia* sp. también incrementaron significativamente la concentración de N de *Acacia tortilis* y el híbrido *Prosopis* (*P. chilensis* y *P. juliflora*); no obstante, los niveles de concentración de P y K no fueron significativos. En contraste, Ebrahimi *et al.* (2016) evidenciaron que el extracto etanólico de la leguminosa *Trifolium alexandrinum* (0.2%) redujo significativamente la concentración de N, P, K, Zn y Mn de la leguminosa arbórea *Prosopis cineraria*.

Acumulación nutrimental en la parte aérea y raíz de frijol y soya

Contrariamente a lo reportado en este estudio, El-Darier (2002) ha documentado el incremento de P y K en haba, frente al efecto alelopático de las hojas pulverizadas de *Eucalyptus rostrata* al 1 y 5%; sin embargo, bajo las mismas condiciones la acumulación de N disminuyó, tal como se observó en la parte aérea de frijol y soya.

Con relación a los efectos de *I. purpurea*, redujo significativamente los valores de acumulación de P en la parte aérea de frijol y soya en la combinación de factores (Figuras 22C y 22F), es probable que debido a los compuestos fitoquímicos que posee ésta, interfiera con la absorción mineral de P, McClure *et al.* (1978) sugieren que sustancias como los compuestos fenólicos afectan la absorción de fosfatos en plantas de soya.

El aumento de la acumulación de N en la raíz de frijol en presencia de *I. purpurea* es equiparable con la acumulación elevada de N en la raíz de *Carex bigelowii* ante los extractos de *Casiopea tetragona*, *Empetrum hermaphroditum* y *Betula tortuosa*. En el

mismo estudio, la acumulación de P en la raíz de *C. bigelowii* y *Festuca vivípara* tuvieron una disminución significativa frente al extracto de *B. tortuosa* (Michelsen *et al.*, 1995). Lo cual coincide con la disminución de P en la raíz de frijol en presencia de la planta alelopática, aunque en la raíz de soya la presencia de ambos factores haya sido benéfica en la acumulación de P. La acumulación de K que fue favorecida en la raíz de frijol coincide con lo reportado por El- Darier (2002), quien detectó el aumento de K en plantas de maíz expuestas al extracto foliar pulverizado de *Eucalyptus rostrata* (1 y 5%); aunque el P no fue afectado.

VIII. CONCLUSIONES

Fase I. Bioensayo con el lixiviado acuoso de *Ipomoea purpurea* en la germinación y longitud radical de frijol y soya

- El lixiviado acuoso de la parte aérea de *Ipomoea purpurea* causó un efecto estimulante en la germinación y longitud radical del frijol a las 24 h. Por el contrario, en la germinación de la soya el efecto fue inhibitorio en la germinación y longitud radical de soya a las 24 h.

Fase II. Efecto de lixiviados acuosos de *Ipomoea purpurea* en el crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici* CIAT899 y *B. japonicum* USDA110

- Los lixiviados acuosos de la raíz y de la parte aérea inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Rhizobium tropici*.

Fase III. Crecimiento y respuesta fisiológica de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* L. Merr.) inoculadas con rizobios en presencia de *Ipomoea purpurea* (L.) Roth

- En general, la inoculación con *R. tropici* mejoró el crecimiento y fisiología de las plantas de frijol, en especial la altura, el volumen de la raíz, biomasa seca total, contenido de clorofila total, fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración.
- La presencia de *Ipomoea purpurea* afecta negativamente el crecimiento de frijol, particularmente, altura, volumen de la raíz. Así mismo, presentó una tendencia a

disminuir las variables fisiológicas (concentración de clorofila total, fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración).

- La inoculación con *B. japonicum* en las plantas de soya en presencia de *I. purpurea*, mostró una tendencia a disminuir los efectos negativos que produce por si sola la planta alelopática, lo cual se refleja en el volumen de la raíz, biomasa seca total y área foliar, principalmente.
- La nodulación es afectada de forma negativa; número de nódulos y actividad nitrogenasa por la incorporación de *I. purpurea* en plantas de frijol.
- La presencia de *I. purpurea* afectó negativamente el área foliar, así mismo disminuyó el concentración de clorofila total, la conductancia estomática y la transpiración de las plantas de soya.
- La inoculación y la presencia de *I. purpurea* incrementan la concentración de clorofila total, la tasa de fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración en plantas de soya.
- El número y la actividad nodular fue beneficiada por *I. purpurea* en plantas de soya.
- La inoculación y/o presencia de *I. purpurea* en las plantas de frijol y soya no fue reflejada en la eficiencia cuántica del fotosistema II.

Fase IV. Concentración y acumulación nutrimental (NPK) de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y soya (*Glycine max*) inoculadas con rizobios, en presencia de *Ipomoea purpurea*

- La inoculación con *R. tropici* incrementa la concentración de N y P, así como, la acumulación de N, P y K de la raíz y parte aérea de las plantas de frijol.

- La inoculación con *B. japonicum* aumenta la concentración de N, P y K en la parte aérea de las plantas de soya y la concentración de N en la raíz; así mismo, incrementa la acumulación de N en la parte aérea y de la raíz de soya.
- La presencia de *I. purpurea* afectó negativamente la acumulación de N y P en la parte aérea de las plantas de frijol. No obstante, aumentó la concentración de N de la parte aérea y de la raíz; y la acumulación de K y N de la parte aérea y de la raíz, respectivamente.
- *Ipomoea purpurea* disminuyó la concentración de P de la parte aérea y de N en la raíz de las plantas de soya; así como la acumulación de N en la parte aérea de la soya. No obstante, favoreció la concentración de K en la parte aérea.
- La presencia de ambos factores inoculación con los rizobios e *I. purpurea* incrementaron la concentración de N y la acumulación de N, P y K en la raíz de las plantas de frijol. Sin embargo, en plantas de soya únicamente aumentó la concentración de P y K de la parte aérea de soya.

IX. CONSIDERACIONES GENERALES

El lixiviado acuoso de raíz y de parte aérea de *I. purpurea* representa una opción efectiva en la germinación de semillas de frijol, pero no en soya, por lo cual se acepta la hipótesis planteada únicamente para *P. vulgaris*.

Existe el efecto alelopático en el crecimiento *in vitro* de *R. tropici*, pero no en *B. japonicum*, por lo cual se acepta la hipótesis en el primer caso.

La interacción de *I. purpurea* con *P. vulgaris* inoculado o no, tuvo efectos negativos en algunas variables del crecimiento, así como en respuestas fisiológicas y en la nodulación del frijol. Por lo anterior la hipótesis es aceptada. Sin embargo, *R. tropici* atenúa el efecto negativo de la alelopatía que ejerce *I. purpurea* en *P. vulgaris*.

La convivencia entre *I. purpurea* y soya tiende a disminuir el crecimiento, así como la respuesta fisiológica de las plantas de soya, por lo cual se acepta la hipótesis planteada. Sin embargo, la inoculación de *B. japonicum* en presencia de *I. purpurea* tiende a mejorar el crecimiento, fisiología y la nodulación de las plantas de soya.

En general, *I. purpurea* afecta negativamente la concentración y acumulación de N, P y K en las plantas de frijol y soya, por lo que la hipótesis se acepta. No obstante, la interacción de *I. purpurea* con *P. vulgaris* inoculado aumenta la concentración de N y la acumulación de P en parte aérea y raíz así como, la acumulación de K en la raíz de las plantas de frijol. Mientras que en soya, la interacción de ambos factores incrementa la concentración de P y K de la parte aérea.

Los resultados de éste trabajo realtan la importancia de llevar a cabo más estudios que nutran y corroboren los efectos de plantas con potencial alelopático en la germinación de semillas, en el crecimiento vegetal, en la nodulación, y en la respuesta fisiológica de leguminosas en simbiosis con rizobios. Además, es recomendable evaluar los efectos directos de plantas alelopáticas sobre los microorganismos simbióticos, ya que el establecimiento de estos simbioses no solo puede ser inhibida, sino también, puede ser un elemento importante en la atenuación de los efectos dañinos producidos por plantas alelopáticas sobre plantas de importancia económica.

X. LITERATURA CITADA

- Achatz, M., E. K. Morris, F. Muller, M. Hilker y M. C. Rilling. 2014. Soil hypha-mediated movement of allelochemicals: arbuscular mycorrhizae extend the bioactive zone of juglone. *Functional Ecology*, 28: 1020-1029.
- Ahmed, H. A., S. M. El-Darier y M. H. Z. El-Dien. 2014. Role of moisture in allelopathic activity of *Medicago sativa* L. residues in *Zea mays* L. fields. *Journal of Global Biosciences*, 3 (5): 835-847.
- Albuquerque, M., R. Santos, L. Lima, P. M. Filho, R. Nogueira y C. C. Ramos. 2011. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. *Agronomy for Sustainable Development*, 31 (2): 379-395.
- Alcántar-González, G., L. I. Trejo-Téllez, L. Fernandez Pavia y M. N. Rodriguez Mendoza. 2012. Elementos esenciales. En: Alcántar-González, G. y L. I. Trejo-Téllez (coord.). 2012. Nutrición de cultivos. *Biblioteca Básica de Agricultura*. México.
- Alcántar-González, G. y M. Sandoval-Villa. 1999. Manual de análisis químico vegetal. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, Mexico.
- Alford, E. R., J. M. Vivanco y M. W. Paschke. 2009. Effects of flavonoid allelochemicals from knapweeds on legume-rhizobia candidates for restoration. *Restoration Ecology*, 17 (4): 506-514.
- Ambika, S. R. 2013. Multifaceted attributes of allelochemicals and mechanism of allelopathy. Pp. 389-405. En: Cheema, Z. A., M. Farooq y A. Wahid (eds). 2013. *Allelopathy. Current Trends and Future Applications*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Anaya, A. 2003. "Ecología Química". Instituto de Ecología, UNAM. México. Pp. 1-33.
- Anaya, A. L., D. J. Sabourin, B. E. Hernández-Bautista e I. Méndez. 1995. Allelopathic potential of *Ipomoea tricolor* (Convolvaceae) in a greenhouse experiment. *Journal of Chemical Ecology*, 2 (8): 1085-1102.
- Appel, H.M. 1993. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal Chemical Ecology*, 19: 1521-1552.
- Aranjuelo, I., C. Arrese-Igor y G. Molero. 2014. Nodule performance within a changing environmental context. *Journal of Plant Physiology*, 171: 1076-1090.
- Arévalo-Barajas, A. 1997. Efecto de algunas plantas con potencial alelopático sobre el establecimiento de la micorriza vesículo arbuscular en suelo calcimagnésicos. Tesis de licenciatura en Biología, Universidad de Guadalajara.

- Arias-Ortiz, H.M., A. López, V. Bernal y E. Castaño. 2011. Caracterización ecológica y Fitoquímica de la batatilla *Ipomoea Purpurea* L. Roth (Solanales, Convolvulaceae) en el municipio de Manizales. Boletín Científico Museo Historia Natural, 15 (2): 19-39.
- Ashraf, R., B. Sultana, S. Yaqoob y M. Iqbal. 2017. Allelochemicals and crop management: A review. Current Science Perspectives, 3 (1): 1-12.
- Bais H. P., R. Vepachedu, S. Gilroy, R. M. Callaway y J. M. Vivanco. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. Science, 301: 1377–1380.
- Bais, H. P., P. Sang-Wook, T. L. Weir, R. M. Callaway y J. M. Vivanco. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. Trends in Plant Science, 9 (1): 26-32.
- Barto, K, J. Weidenhamer, D. Cipollini y M. Rillig. 2012. Fungal superhighways: do common mycorrhizal networks enhance below ground communication? Trends in Plant Science, 17 (11): 633-637.
- Batish, D. R., K. Lavanya, H. P. Singh y R. K. Kohli. 2007. Phenolic allelochemicals released by *Chenopodium murale* affect the growth, nodulation and macromolecule content in chickpea and pea. Plant Growth Regulation, 51: 119-128.
- Berendsen R. L., C. M. Pieterse y P. A. Bakker. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science, 17: 478- 486.
- Bertin, C., X. Yang y L. A. Weston. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant and Soil, 256: 67-83.
- Bhatt, B. P., D. S. Chauhan y N. P. Todaria. 1994. Effect of weed leachates on germination and radicle extension of some food crops. Indian Journal of Plant Physiology, 37 (3): 177-179.
- Brouwer N. L., A. N. Hale y S. Kalisz. 2015. Mutualism-disrupting allelopathic invader drives carbon stress and vital rate decline in a forest perennial herb. AoB PLANTS, 7: plv014; doi:10.1093/aobpla/plv014.
- Caffarri, S., R. Kouril, S. Kereiche, E. J. Boekema y R. Croce. 2009. Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. European Molecular Biology Organization, EMBO Journal, 28: 3052-3063.
- Callaway, R. M. y W. M. Ridenour. 2004. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. Frontiers in Ecology and the Environment, 2 (8): 436-443.

Callaway R. M., D. Cipollini, K. Barto, G. C. Thelen, S. G. Hallett, D. Prati, K. Stinson y J. Klironomos. 2008. Novel weapons: invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology*, 89 (4): 1043-1055.

Christina, M., S. Rouifed, S. Puijalon, F. Vallier, G. Meinffren, F. Bellvert y F. Piola. 2015. Allelopathic effect of a native species on a major plant invader in Europe. *The Science of Nature*, 102 (12): 1-8.

Cipollini D., C. M. Rigsby E. K. Barto. 2012. Microbes as targets and mediators of allelopathy in plants. *Journal of Chemical Ecology*, 38: 714-727.

CONABIO, 2016a. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.htm#1>. Nombres. Fecha de consulta 3 de enero de 2016.

CONABIO, 2016b. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/convolvulaceae/ipomoea-purpurea/fichas/ficha.htm>. Fecha de consulta 3 de enero 2016.

Cruz-Ortega, R., A. Lara-Núñez y A.L. Anaya. 2007. Allelochemical stress can trigger oxidative damage in receptor plants. *Plant Signaling and Behavior*, 2 (4): 269-270.

Czarnota M.A., Paul RN, Dayan FE, Nimbal CI, Weston LA. 2001. Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PS II inhibitor in *Sorghum* spp. Root exudates. *Weed Technol*, 15: 813-825

Daita, F. E., E. J. Zorza y E. Fernández. 2011. Quinto congreso de la Soja del Mercosur y Primer Foro de la Soja Asia-Mercosur. http://www.acsoja.org.ar/images/cms/contenidos/328_b.pdf . Fecha de consulta 28 de febrero de 2016.

Dawson, J. O. y P. E. Seymour. 1983. Effects of juglone concentration on growth in vitro of *Frankia* ArI3 and *Rhizobium japonicum* strain 71. *Journal of Chemical Ecology*, 9 (8): 1175-1183.

Defelice, M. 2001. Tall morningglory, *Ipomoea purpurea* (L.) Roth-flower or foe?. *Weed Technology*, 15: 601-606.

Dresler-Nurmi, A., D. P. Fewer, L. A. Räsänen y K. Lindström. 2009. The diversity and evolution of rhizobia. *Microbiology Monographs*, 8: 3-41.

Ebrahimi, M., A. R. Maryshany y E. Shirmohammadi. 2016. Effect of extracts of fast growing species *Trifolium alexandrinum* L. on germination, photosynthetic pigments and nutrient uptake of *Prosopis cineraria* (L.) Druce. *Ecopersia*, 4 (3): 1493-1503.

El-Darier, S. M. 2002. Allelopathic effects of *Eucalyptus rostrate* on growth, nutrient uptake and metabolite accumulation of *Vicia faba* and *Zea mays* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5 (1): 6-11.

- El-Khatib, A. A., N. A. Barakat y H. Nazeir. 2016. Growth and physiological response of some cultivated species under allelopathic stress of *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Applied Science Reports, 14 (3): 237-246.
- Farooq M, A. A. Bajwa, S. A. Cheema y Z. A. Cheema. 2013. Application of allelopathy in crop production. International Journal of Agriculture and Biology, 15: 1367-1378.
- Fernández, C., Y. Monnier, M. Santoja, C. Gallet, L. A. Weston, B. Prévosto, A. Saunier, V. Baldy y A. Bousquet-Mélou. 2016. The impact of competition and allelopathy on the trade-off between plant defense and growth in two contrasting tree species. Frontier in Plant Science, 7: 594.
- Ferguson, B.J., A. Indrasumunar, S. Hayashi, M. Lin, Y. Lin, D. Reid, y P. Gresshoff. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology, 52 (1): 61–76.
- Ferrera-Cerrato, R. 2007. Simbiosis. En: Ferrera-Cerrato, R. y A. Alarcón. Microbiología agrícola. Trillas. México. Pp. 225-238.
- Gage, D. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68 (2): 280–300.
- García-Rodríguez, J.C., A. González-Jiménez, G. Ascencio-Luciano, M. A. Vega-Loera y A. Hernández-Livera. 2014. Calidad fisiológica de la semilla de soya [*Glycine max.* (L.) Merr.], producida en dos regiones de México. Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan 2 (3): 223-231.
- Gibson, K.E., H. Kobayashi y G. Walker. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. Ann. Rev. Genet. 42: 413–441.
- Granda Mora, K. I., M. C. Nápoles García, A. R. Robles Carrión, Y. Alvarado Capo y R. Torres Gutiérrez. 2016. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* cv, Mantequilla a la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador en casas de cultivo. Centro Agrícola, 43 (4): 49-56.
- Gremer J. R. y A. Sala. 2013. It is risky out there: the costs of emergence and the benefits of prolonged dormancy. Oecologia, 172: 937–947.
- Gruntman, M., S. Zieger y K. Tielbörger. 2015. Invasive success and the evolution of enhanced weaponry. Oikos, 125: 59-65
- Gulzar, A. y M. B. Siddiqui. 2015. Root-mediated allelopathic interference of bhringraj (*Eclipta alba* L. Hassk. on peanut (*Arachis hypogaea*) and mung bean (*Vigna radiata*). Applied Soil Ecology, 87: 72-80.

- Haag, A., M. M. F. F. Arnold, K.K. Myka, B. Kerscher, S. Dall'Angelo, M. Zanda, P. Mergaert y G. P. Ferguson. 2013. Molecular insights into bacteroid development during rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 37: 364–383.
- Hale A. N., S. J. Tonsor y S. Kalisz. 2011. Testing the mutualism disruption hypothesis: physiological mechanisms for invasion of intact perennial plant communities. *Ecosphere*, 2:art110.
- Hankamer, B. y J. Barber. 1997. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 641-671.
- Hao W.Y, L. X. Ren, W. Ran y Q. R. Shen. 2010. Allelopathic effects of root exudates from watermelon and rice plants on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant Soil*, 336: 485-497.
- Harborne, J. B. 1998. *Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plants analysis*. 3ra edición, Chapman & Hall. London. 302 pp.
- Hassan, S. y U. Mathesius. 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signaling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, 63 (9): 3429-3444.
- Hättenschwiler, S. y P. M. Vitousek. 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution*, 15 (6): 238-243.
- Heath, K. D. 2010. Intergenomic epistasis and co-evolutionary constraint in plants and rhizobia. *Evolution*, 64: 1–13.
- Heckman, J. R. y D. Kluchinski. 1995. Soybean nodulation amended with plant residues. *Biology and Fertility of Soils*, 20: 284-288.
- Hierro J. L. y R. M. Callaway. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant Soil*, 256: 25–39.
- Hima J. Khamar, H., E. Breathwaite, C. Prasse, E. Fraley, C. Secor, F. Chibane, J. Elhai, y C. Wan-Ling. 2010. Multiple Roles of Soluble Sugars in the Establishment of *Gunnera-Nostoc* endosymbiosis. *Plant Physiology*, 154: 1381-1389.
- Hopkins, W. G. y N. P. A. Huner. 2008. *Introduction to the plant physiology*. 4th ed. Wiley, USA.
- Huckelhoven R y K.H. Kogel. 2003. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta*, 216: 891-902.

Hussain, M. I., L. González y M. J. Reigosa. 2008. Germination and growth response of four plant species towards different allelochemicals and herbicides. *Allelopathy Journal*, 22(1): 101-110

Hussain M. I. y M. J. Reigosa. 2011a. Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, nonphotochemical fluorescence quenching, and heat energy dissipation in three C-3 perennial species. *Journal of Experimental Botany*, 62: 4533-4545.

Hussain M. I. y M. J. Reigosa. 2011b. A chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic efficiency, quantum yield and photon energy dissipation in PSII antennae of *Lactuca sativa* L. leaves exposed to cinnamic acid. *Plant Biochemistry Physiology*, 49: 1290-1298.

Hussain, M. I., M. J. Reigosa y A. J. Al-Dakheel. 2015. Biochemical, physiological and isotopic responses to natural product *p*-hydrobenzoic acid in Cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). *Plant Growth Regulation*, 75: 783-792.

Inderjit, S. y S. O. Duke. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, 217: 529-639.

Inderjit, R. M., J. M. Callaway y J. M. Vivanco. 2006. Plant biochemistry helps to understand invasion ecology. *Trends in Plant Science*, 11: 574–580

Jabran, M., M. Farooq, T. Aziz y K. H. M. Siddique. 2013. Allelopathy and crop nutrition. Pp 337-348. En: Cheema, Z. A., M. Farooq y A. Wahid (eds).2013. *Allelopathy. Current Trends and Future Applications*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Jabran, K., G. Mahajan, V. Sardana y B. S. Chauhan. 2015. Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection*, 72: 57-65.

Jalaei, Z. M. Fattahi y S. Aramideh. 2015. Allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Dracocephalum kotschy* Boiss. From Iran: A new chemotype with highest limonene-10-al and limonene. *Industrial Crops and Products*, 73: 109-115.

Janczarek, M., K. Rachwał, A. Marzec, J. Grzadziel y M. Palusinska-Szys. 2015. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology*, 85: 94–113.

Jilani, G., S. Mahmood, A. N. Chaudhry, I. Hassan y M. Akram. 2008. Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil – a review. *Annals of Microbiology*, 58 (3): 351-357.

Joachim, M. y P. Ndakidemi. 2007. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*, 6 (12): 1358-1368.

- Kalaji H. M., A. Jajoo, A. Oukarroum, M. Brestic, M. Zivcak, I. A. Samborska, M. D. Cetner, I. Lukasik, V. Goltsev y R. J. Ladle. 2016. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plant under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38:102
- Kereszt, A. y E. Kondorosi. 2011. Unlocking the door to invasion. *Science*, 331: 865–866.
- Khanna, V., G. Singh, P. Sherma y H. Kaur. 2012. Influence of herbicides on *Rhizobium* growth and its symbiosis with pigeonpea. *Trends in Biosciences*, 5 (2): 133-135.
- Kobayashi K. 2004. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biol Manag.* 4:1-7.
- Koocheki, A., B. Lalegani y S. A. Hosseini. 2013. Ecological consequences of allelopathy. pp 23-38. En: Cheema, Z. A., M. Farooq y A. Wahid (eds).2013. *Allelopathy. Current Trends and Future Applications*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kroymann J. 2011. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 246-251.
- Kruse, M., M. Strandberg y B. Strandberg. 2000. Ecological Effects of Allelopathic Plants –a Review. NERI Technical Report, 35. National Enviromental Research Institute. Denmark. Pp. 66.
- Li Q, L. Ling Yuan y J. Huang. 2014. Allelopathic effects of artemisinin on ectomycorrhizal fungal isolates in vitro. *Pedobiologia-Journal of Soil Ecology*, 57: 271-276.
- Li L, S. M. Li, J. H. Sun, L. L. Zhou, X. G. Bao, H. G. Zhang, y F. S. Zhang. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104: 11192–11196
- Lorenzo, P., A. Palomera-Perez, M. J. Reigosa y L. González. 2011. Allelopathic interference of invasive *Acacia dealbata* Link on the physiological parameters of native understory species. *Plant Ecology*, 2012: 403-412.
- Lorenzo P. y L. González. 2010. Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. *Ecosistemas*, 19 (1): 79-91.
- Lorenzo, P., E. Pazos-Malvido, L. González y M. J. Reigosa. 2008. Allelopathic interference of invasive *Acacia dealbata*: physiological effects. *Allelopathy Journal*, 22 (2): 64-76.
- Lorenzo, P., M. I. Hussain y L. González. 2013. Role of allelopathy during invasion process by alien invasive plants in terrestrial ecosystems. Pp. 11-20. En: Cheema, Z. A., M. Farooq y A. Wahid (Eds). Springer. Pp 517.

- Mahmoud, Y. A. G., M. K. H. Ebrahim y M. M. Aly. 2004. Influence of some plant extracts and microbioagents on some physiological traits of faba bean infected with *Botrytis fabae*. Turkish Journal of Botany, 28: 519-528.
- Maldonado-Moreno, N. y G. Ascencio-Luciano. 2010. Huasteca 100, variedad de soya para el sur de Tamaulipas y trópico de México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 1 (5): 699-705.
- Mallik, M. A. B. y K. Tesfai. 1987. Stimulation of *Bradyrhizobium japonicum* by allelochemicals from green plants. Plant Soil, 103: 227-231.
- Mallik, M. A. B. y K. Tesfai. 1988. Allelopathic effect of common weeds on soybean growth and soybean-*Bradyrhizobium* symbiosis. Plant and Soil, 112: 177-182.
- Mapope, N. y F. D. Dakora. 2016. N₂ fixation, carbon accumulation, and plant water relations in soybean (*Glycine max* L. Merrill) varieties sampled from farmer's fields in South Africa, measured using ¹⁵N and ¹³C natural abundance. Agriculture, Ecosystem and Environment, 221: 174-186.
- Marchiosi, R., G. S. Bido, P. A. Feitoza, A. R. Soares, H. A. da Silva, A. P. Ferro, M. L. Lucio y O. Ferrarese-Filho. 2016. Photosynthetic response of soybean to L-DOPA and aqueous extract of velvet bean. Plant Growth Regulation. DOI 10.1007/s10725-016-0154-2
- Maron, J. L. y M. Marler. 2007. Native plant diversity resists invasion at both low and high resource levels. Ecology, 88: 2651-2661.
- Masson-Boivin, C. 2016. Small is plentiful. Trends in Plant Science, 1 (3): 173-175.
- Masson-Boivin, C., E. Giraud, X. Perret, y J. Batut. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes. Trends in Microbiology, 17: 458-466.
- McClure, P. R., H. D. Gross y W. A. Jackson. 1978. Phosphate absorption by soybean varieties: the influence of ferulic acid. Canadian Journal of Botany, 56: 764-767.
- McGeoch, M. A., S. H. M. Butchart, D. Spear, E. Marais, E.J. Kleynhans, A. Symes, J. Chanson y M. Hoffmann. 2010. Global indicators of biological invasion: species numbers, biodiversity impact and policy responses. Diversity and Distributions, 16: 95-108.
- Meazza, G., B. E. Scheffler, M. R. Tellez, A. M. Rimando, J. G. Romagni, S. O. Duke, D. Nanayakkara, I. A. Khan, E. A. Abourashed y F. E. Dayan. 2002. The inhibitory activity of natural products on plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Phytochemistry, 59: 281-288.
- Meiners, S. J. 2014. Functional correlates of allelopathic potential in a successional plant community. Plant Ecology, 215: 661-672.

- Meira, M., E. Pereira-da Silva, J. M. David y J. P. David. 2012. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22 (3): 682-713.
- Michelsen, A., I. K. Schmidt, S. Jonasson, J. Dighton, H. E. Jones y T. V. Callaghan. 1995. Inhibition of growth, and effects on nutrient uptake of arctic graminoids by leaf extracts - Allelopathy or resource competition between plants and microbes? *Oecologia*, 103: 407-418.
- Miransari, M. 2014. The interactions of soil microbes, arbuscular mycorrhizal fungi and N-fixing bacteria *Rhizobium*, under different conditions including stress. Pp. 1-21 En: Miransari, M. (Ed.). Use of microbes for the alleviation of soil stresses. Vol 2: Alleviation Of Soil Stress by PGPR and Mycorrhizal Fungi. New York, Springer.
- Mishra, A. 2015. Effect of *Lantana camara* leaf aqueous extracts on transpiration rate of some plants. *Zenith International Journal of Multidisciplinary Research*, 5 (1): 130-134.
- Muñoz-Saldaña, R. 2010. Frijol, rica fuente de proteínas. *CONABIO. Biodiversitas*, 89: 7-11.
- Murchie, E. H. y T. Lawson. 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64 (13): 3983-3998.
- Murrell C, E. Gerber, C. Krebs, M. Parepa, U. Schaffner y U. Bossdorf. 2011. Invasive knotweed affects native plants through allelopathy. *American Journal of Botany*, 98(1): 38-43.
- Muturi, G. M., L. Poorter, P. Bala y G. M. J. Mohren. 2017. Unleached *Prosopis* litter inhibits germination but leaches stimulates seedling growth of dry Woodland species. *Journal of Arid Environments*, 138: 44-50.
- Muzel-Trezzi, M., R. Antônio Vidal, A. A. Balbinot Junior, H. von Hertwig ittencourt y A. P. da Silva Souza Filho 2016. Allelopathy: driving mechanisms governing its activity in agriculture, *Journal of Plant Interactions*, 11(1): 53-60.
- Nakajima N, S. Hiradate y Y. Fuji. 2001. Plant growth inhibitory activity of L-canavanine and its mode of action. *Journal of Chemical Ecology*, 27:19-31.
- Naamala, J., S. K. Jaiswal y F. D. Dakora. 2016. Microsymbiont diversity and phylogeny of native bradyrhizobia associated with soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation in South African soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 39: 336-344.
- Narwal S. S. 2010. Allelopathy in ecological sustainable organic agriculture. *Allelopathy Journal*, 25:1-72.

Nuñez-Escobar, R. 2012. El suelo como medio natural en la nutrición de los cultivos. En: Alcántar-González, G. y L. I. Trejo-Téllez (coord.). 2012. Nutrición de cultivos. *Biblioteca Básica de Agricultura*. México.

Oburger, E. y H. Schmidt. 2016. New methods to unravel rhizosphere processes. *Trends in Plant Science*, 21 (3): 243-255.

Oldroyd, G. E. E., J. D. Murray, P. S. Poole y J. A. Downie. 2011. The rules of engagement in the legume-Rhizobium symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 14: 119–144.

Peck, M. C., R. F. Fisher y S. R. Long. 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 188 (15): 5417-5427.

Pimentel, A. R., A. A. Lucchesi y M. Ribeiro. 1997. Efeito alelopático de especies de *Brachiaria griseb* sobre algunas leguminosas forrageiras tropicais. II. Avaliações em casa de vegetação. *Boletim de Indústria Animal*, 54 (2): 45-54.

Portales-Reyes, C., T. V. Doornik, E. H. Schultheis y T. Suwa. 2015. A novel impact of a novel weapon: allelochemicals in *Alliaria petiolata* disrupt the legume-rhizobia mutualism. *Biological Invasions*, 17: 2779-2791.

Rice, E. L., L. Chu-Yung y H. Chi-Ying. 1981. Effects of decomposing rice Straw on growth of and nitrogen fixation by *Rhizobium*. *Journal of Chemical Ecology*, 7(2): 333-344.

Ríos, C. y M. Rosabal. 2008. Potencial alelopático de bambues tropicales. Efecto sobre la germinación y el crecimiento de cultivos tropicales. *Centro Agrícola*, 35 (2): 79-84.

Rodríguez-Mendoza, M.N. 1993. Asociación *Rhizobium*-Leguminosa. En: Ferrera-Cerrato, R., González-Chávez, M. C. A. y Rodríguez-Mendoza, M.N. 1993. Manual de agromicrobiología. *Trillas*. México.

Rhouhrazi, K., G. Khodakaramian y E. Velazquez. 2016. Phylogenetic diversity of rhizobial species and symbiovars nodulating *Phaseolus vulgaris* in Iran. *FEMS Microbiology Letters*, 363: 1-9.

Rodríguez-Echeverría, S. 2009. Organismos del suelo: la dimensión invisible de las invasiones por plantas no nativas. *Ecosistemas* (18): 32-43.

Rout M. E. y R. M. Callaway. 2009. An invasive plant paradox. *Science*, 324:734-735.

Sanz-Saez, A., K. D. Heath, P. V. Burke y E. A. Ainsworth. 2015. Inoculation with an enhanced N₂-fixing *Bradyrhizobium japonicum* strain (USDA110) does not alter soybean (*Glycine max* Merr.) response to elevated CO₂. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/pce.12577

- Schulz, M., A. Marocco, V. Tabaglio, F. A. Macias y J. M. Molinillo. 2013. Benzoxazinoids in rye allelopathy-from discovery to application in sustainable weed control and organic farming. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 154-174.
- Schutte, B. J. y A. Cunningham. 2015. Tall Morningglory (*Ipomoea urpurea*) Seedbank Density Effects on Pedimethalin Control Outcomes. *Weed Science Society of America*, 29 (4): 844-853.
- Subramaniam, S., G. Stacey y O. Yu. 2007. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science*, 12: 282-285.
- Svensson J. R., G. M. Nylund, G. Cervin, G.B. Toth y H. Pavia. 2013. Novel chemical weapon of an exotic macroalga inhibits recruitment of native competitors in the invaded range. *Journal of Ecology*, 101:140–148.
- Takao, L. K., J. P. N. Ribeiro y M. F. Salgueiro. 2011. Allelopathic effects of *Ipomoea cairica* (L.) Sweet on crop weeds. *Acta Botánica Brasilica*, 25(4): 858-864.
- Tesfamariam T, H. Yoshinaga, S. P. Deshpande, P. Srinivasa Rao, K. L. Sahrawat, Y. Ando, K. Nakahara, C. T. Hash y G. V. Subbarao. 2014. Biological nitrification inhibition in sorghum: the role of sorgoleone production. *Plant Soil*, 379: 325-335.
- Torres, A., R. M. Oliva, D. Castellano, P. Cross. 1996. *First World Congress on Allelopathy. A Science of the Future*. pp. 278. SAI (University of Cadiz). Cadiz, Spain.
- Torres-García, S., M. Hernández-Aro, M. Puente Isidron, F. De Cupere y P. Van Damme. 2006. Efecto alelopático de *Phyla strigulosa* sobre la germinación y crecimiento de cultivos. *Centro agrícola*. 33(2): 69-73.
- Urzua-Soria, F., J. Kohashi Shibata, B. Figueroa Sandoval y A. Martínez Garza. 2002. Dinámica poblacional de malezas en diferentes sistemas de labranza y métodos de control en la rotación trigo-maíz. *Agricultura Técnica en México*, 28 (29): 105-123.
- van Hameren, B., S. Hayashi, P. Gresshoff y B. Ferguson. 2013. Advances in the identification of novel factors required in soybean nodulation, a process critical to sustainable agriculture and food security. *Journal of Plant Biology, Soil Health*, 1(1): 6.
- Venturi, V. y C. Keel. 2016. Signaling in the rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21(3): 187-198.
- Villaneva-Tarazona, E. E. y A. Quintana-Díaz. 2012. Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. *Revista científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 32 (1): 24-103.
- Wang, L., Y. Cao, E. T. Wang, Y. J. Qiao, S. Jiao y Z. S. Liu. 2016. Systematic and Applied Microbiology, 39: 211-219.

Wang T., J. Martínez-Romero e I. López- Lara. 2015. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. UNAM. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/> Fecha de consulta: 20 de Julio de 2015.

Weir, T.L., S.W. Park y J.M. Vivanco. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:472–479.

Weston, L. A. y U. Mathesius. 2013. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 283-297.

Wu H., J. Pratley, D. Lemerle y T. Haig. 2001. Allelopathy in wheat (*Triticum aestivum*), *Annals of Applied Biology*, 139: 1–9.

Yu, J.Q., S. F. Ye, M. F. Zhang y W. H. Hu. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*), and allelochemicals on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31:129-139.

Zhang C.B., Wang J, Qian BY y Li WH. 2009. Effects of the invader *Solidago canadensis* on soil properties. *Applied Soil Ecology* 43(2-3):163-169.

Zhang K. M., Y. Shen, X. Q. Zhou, Y. M. Fang, Y. Liu y L. Q. Ma. 2016. Photosynthetic electron-transfer reactions in the gametophyte of *Pteris multifida* reveal the presence of allelopathic interference from the invasive plant species *Bidens pilosa*. *J Photochem Photobiology B*, 158:81-88.

Zhang, X. X., S. L. Turner; X. W. Guo, H. J. Yang, F. DeBelle, G. P. Yang, J. Denarie, J. P. Young y F. D. Li. 2000. The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2988-95.

Zhou, Y. H. y J. Q. Yu. 2006. Allelochemicals and Photosynthesis. En: Reigosa, M. J., N. Pedrol y L. Gonzalez (Eds.). *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer. Netherlands. Pp. 127-156.

Zhu, X., J. Zhang, K. Ma. 2011. Soil biota reduce allelopathic effects of the invasive *Eupatorium adenophorum*. *PLOS ONE*, 6 (9): 1-6.

Zhu, W., J. Liu, J. Ye y G. Li. 2017. Effects of phytotoxic extracts from peach root bark benzoic acid on peach seedlings growth, photosynthesis, antioxidance and ultrastructure properties. *Scientia Horticulturae*, 215: 49-58.

Zohaib, A. T. Abbas y T. Tabassum. 2016. Weeds cause losses in field crops through allelopathy. *Notulae Scientia Biologicae*, 8 (1): 47-56.

XI. APÉNDICE

1. Extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMARC)

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	1.5 g
Rojo congo	10 mL
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
Ajustar pH a 7	
Esterilizar el medio a 18 lb por 18 minutos	

2. Caldo extracto de levadura manitol (CELM)

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	1.5 g
Agua destilada	1000 mL
Ajustar pH a 7	
Esterilizar el medio a 18 lb por 18 minutos	

3. Solución Jensen

CaHPO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl ₃	0.1 g
micronutrientes	1 mL
agua destilada	1000 mL
pH	7
micronutrimientos	
H ₃ BO ₃	0.5 g
MnSO ₄	0.05 g
ZnSO ₄	0.5 g
Na ₂ MoO ₄	0.05 g
CuSO ₄	0.05 g
agua destilada	1000 mL