



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Nacional de Estudios Superiores,  
Unidad Morelia

INOCULACIÓN DE PROMOTORES DE  
CRECIMIENTO Y DIFERENTES DOSIS DE  
FERTILIZACIÓN FOSFORADA EN CEBADA  
(*Hordeum vulgare*)

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

JUAN LUIS SUÁREZ ÁLVAREZ

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. DANTE ALEJANDRO LÓPEZ CARMONA  
CO DIRECTOR: Dr. JOHN LARSEN

MORELIA, MICHOACÁN

FEBRERO, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA  
SECRETARÍA GENERAL  
SERVICIOS ESCOLARES

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UNAM**  
**PRESENTE.**

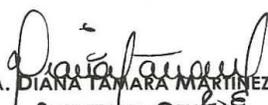
Por medio de la presente me permito informar a usted que en la sesión ordinaria 10 del H. Consejo Técnico de la ENES Unidad Morelia celebrada, el día 01 de octubre del 2015, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el Examen Profesional del alumno **JUAN LUIS SUÁREZ ÁLVAREZ** con número de cuenta **411100676**, con la tesis titulada: "**Inoculación de promotores de crecimiento y diferentes dosis de fertilización fosforada en cebada (*Hordeum vulgare*)**". Bajo la dirección del Tutor del **M. en C. Dante Alejandro López Carmona** y como Co-tutor el **Dr. John Larsen**.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dr. Pablo Jaramillo López  
Secretario: M. en C. Dante Alejandro López Carmona  
Vocal: Dr. Javier Villegas Moreno  
Suplente: Dr. John Larsen  
Suplente: Dra. Mariela Gómez Romero

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Morelia, Michoacán a, 02 de octubre del 2015.

  
DRA. DIANA TAMARA MARTÍNEZ RUIZ  
SECRETARIA GENERAL

CAMPUS MORELIA

Apartado Postal 27-3 (Santa Ma. De Guído), 58090, Morelia, Michoacán  
Antigua Carretera a Pátzcuaro N° 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta  
58190 Morelia Michoacán México Tel: (443) 322 38 05 v (51) 56 23 28 05

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradezco a la Licenciatura en Ciencias Ambientales de la UNAM por ofrecerme la oportunidad de estudiar una licenciatura de calidad.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca para la realización de mi proyecto de tesis. El presente proyecto de investigación fue financiado por el proyecto: PROINOVA-CONACyT 2013 “Desarrollo de Procesos Nano y Micro Biotecnológicos para Elaborar Inoculantes Asepticos Enriquecidos con Promotores del Crecimiento Vegetal” con Número de registro: 198839.

Agradezco a Dante Alejandro López Carmona por su asesoría, paciencia, confianza y su apoyo en toda la realización del presente documento. También quiero agradecer a John Larsen por haberme recibido en el Laboratorio de Agroecología y por haberme ofrecido de igual manera su asesoría y confianza en todo momento.

Agradezco al Dr. Javier Villegas Moreno, representante del proyecto PROINOVA-CONACyT 2013 por sus aportaciones durante el desarrollo de esta investigación.

Agradezco al Dr. Javier Lara Romero y al Dr. Jesús Campos García de la Facultad de Ingeniería Química, UMSNH por habernos facilitado los nanotubos de carbono, así como los exudados de *Pseudomonas* spp. utilizados en el experimento.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A todos los compañeros del laboratorio: Netza, Ceci, Marcela, Omar, Guadalupe, Mónica, Donovan, Clara, Ricardo, Carlos, Miguel, Dante, John por ofrecerme su amistad y confianza, además de sus aportaciones y consejos para mi investigación.

A mi madre Lorena por ser una persona tan fuerte, trabajadora y por el apoyo que me ha dado toda la vida.

A mi padre Juan por el apoyo que siempre me han dado y por alentarme a seguir siempre adelante.

A mis hermanos Lorena y Marco porque siempre han estado ahí cuando los necesito.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	9
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
ÍNDICE DE ANEXOS .....	12
RESUMEN .....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. ANTECEDENTES .....	16
2.1. Rizósfera .....	16
2.2. Biofertilizantes .....	16
2.2.1. Uso de biofertilizantes en la agricultura .....	18
2.3. Hongos micorrícicos .....	19
2.3.1. Generalidades .....	19
2.3.2. Tipos de asociación micorrícica .....	20
2.3.3. Hongos micorrícicos arbusculares .....	21
2.3.4. Ciclo de vida de los HMA y las diferentes etapas a lo largo del desarrollo de HMA .....	21
2.4. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	23
2.4.1. Generalidades .....	23
2.4.2. Tipos de bacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	24
2.4.3. Rizobacterias del género <i>Pseudomonas spp.</i> .....	24
2.4.4. Mecanismos de promoción del crecimiento en plantas asociado a <i>Pseudomonas spp.</i> .....	25
2.5. Nanotubos de carbono .....	25
2.5.1. Generalidades .....	25
2.5.2. Tipos de nanotubos de carbono .....	26
2.5.3. Síntesis de nanotubos de carbono por el método spray pirolisis .....	27
2.5.4. Uso de nanotubos de carbono en agricultura .....	27
2.6. Cebada ( <i>Hordeum vulgare</i> ) .....	28
2.6.1. Panorama nacional del cultivo de cebada .....	29
2.6.2. Panorama estatal del cultivo de cebada .....	30
2.6.3. Uso de biofertilizantes en <i>Hordeum vulgare</i> .....	30
3. HIPÓTESIS .....	32

<b>4. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Objetivos particulares .....</b>	<b>32</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1. Materiales biológicos .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2. Diseño experimental .....</b>	<b>33</b>
5.2.1. <i>Análisis estadístico</i> .....	34
<b>5.3. Siembra e inoculación de tratamientos .....</b>	<b>34</b>
<b>5.4. Condiciones, establecimiento y crecimiento de plantas.....</b>	<b>34</b>
<b>5.5. Estimación de la capacidad de campo del suelo para homogenizar el riego ..</b>	<b>35</b>
<b>5.6. Variables medidas.....</b>	<b>35</b>
5.6.1. Desempeño vegetal .....	35
5.6.2. Estimación del porcentaje de colonización micorrízica .....	36
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>6.1. Evaluación de la interacción entre biofertilizantes y fertilización fosforada en el desarrollo de HMA y cebada. ....</b>	<b>37</b>
6.1.1. Altura de planta.....	38
6.1.2. Peso aéreo seco.....	41
6.1.3. Peso seco de raíz .....	42
6.1.4. Relación raíz/tallo.....	43
6.1.5. Peso seco de espiga y número de semillas.....	44
6.1.6. Colonización.....	45
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
7.1. Efecto de los biofertilizantes en el desempeño vegetal de la cebada .....	47
7.2. Efecto del fósforo, nanotubos de carbono y promotores del crecimiento de cebada sobre la colonización micorrízica .....	48
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>9. EXPECTATIVAS Y LIMITACIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>52</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Características generales de los hongos micorrícicos.

**Tabla 2.** Producción anual de cebada destinada a forraje, grano y semilla en México 2010-2013.

**Tabla 3.** Diseño experimental.

**Tabla 4.** Tratamientos.

**Tabla 5.** Inoculación de semillas con biofertilizantes.

**Tabla 6.** Valores de p del análisis de varianza multifactorial de 3 vías para el desempeño vegetal bajo tres escenarios de fertilización fosforada y ocho biofertilizantes.

**Tabla 7.** Valores de p del análisis de varianza de 2 vías para el desempeño vegetal y colonización de raíces bajo tres escenarios de fertilización fosforada y ocho biofertilizantes.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Fig. 1.** Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (efectos positivos y negativos) asociados con el suelo y los microorganismos de la rizósfera, modificado de Richardson et al., 2009.

**Fig. 2.** Ciclo de vida de un hongo micorrícico arbuscular y las distintas etapas en su desarrollo, modificado de Bücking et al. 2012.

**Fig. 3.** A) Representación de la estructura de un nanotubo de pared sencilla (SWCNT) B) Representación de la estructura de un nanotubo de pared múltiple (MWCNT) (IBMC, 2014).

**Fig. 4.** Método de síntesis de nanotubos de carbono por spray pirolisis tomada de Díaz (2008).

**Fig. 5.** Altura final de plantas de cebada inoculadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de Fósforo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de  $n=6$  y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .

**Fig. 6.** Registro de altura luego de ocho semanas de desarrollo de plantas de cebada inoculadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de Fósforo. Del lado izquierdo a) se muestran los tratamientos con biofertilizantes solos. Del lado derecho b) se muestran los tratamientos con biofertilizantes combinados.

**Fig. 7.** Peso seco de la parte aérea de las plantas de cebada inoculadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo tres escenarios de fertilización con Fósforo de 0mg, 50mg y 100mg. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de  $n=6$  y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .

**Fig. 8.** Peso seco de raíces de plantas de cebada inoculadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo tres escenarios de fertilización con Fósforo de 0mg, 50mg y 100mg. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de  $n=6$  y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .

**Fig. 9.** Relación raíz-tallo de plantas de cebada tratadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de Fósforo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de  $n=6$  y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .

**Fig. 10.** a) Peso seco de la espiga y b) número de semillas de plantas de cebada tratadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de Fósforo. Se muestra

el promedio con barras de error estándar estimados a partir de  $n=6$  y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .

**Fig. 11.** Porcentaje de colonización en plantas de cebada tratadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de Fósforo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de  $n=6$  y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .

**Fig. 12.** Comparación de plantas testigo con plantas micorrizadas a las 3 semanas de crecimiento. a) Plantas testigo; b) Plantas tratadas con *Rizofagus irregularis*. Se ilustran los niveles de fertilización fosforada (0mg, 50mg, 100mg).

**Fig. 13.** Comparación de plantas testigo con plantas micorrizadas a las 8 semanas de crecimiento. a) Plantas testigo; b) Plantas tratadas con *Rizofagus irregularis*. Se ilustran los niveles de fertilización fosforada (0mg, 50mg, 100mg).

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis edafológico del suelo utilizado.

**Anexo 2.** Desempeño vegetal. Análisis de varianza 3 factores (F1: HMA, F2: nanotubos y F3: promotor de crecimiento). En cada tratamiento se muestra la media seguida de la desviación estándar resultante del análisis estadístico.

**Anexo 3.** Desempeño vegetal. Análisis de varianza 3 factores (F1: HMA, F2: nanotubos y F3: promotor de crecimiento). En cada tratamiento se muestra el grupo homologo resultante del análisis estadístico.

**Anexo 4.** Pruebas de Múltiple Rangos para ALTURAS FINALES por Tratamiento\_ General.

**Anexo 5.** Pruebas de Múltiple Rangos para PESO SECO AÉREO por Tratamiento\_ General.

**Anexo 6.** Pruebas de Múltiple Rangos para PESO SECO RAÍZ por Tratamiento\_ General.

**Anexo 7.** Pruebas de Múltiple Rangos para RELACIÓN RAÍZ/TALLO por Tratamiento\_ General.

**Anexo 8.** Pruebas de Múltiple Rangos para PESO SECO ESPIGA por Tratamiento\_ General.

**Anexo 9.** Pruebas de Múltiple Rangos para NÚMERO DE SEMILLAS por Tratamiento\_ General.

**Anexo 10.** Pruebas de Múltiple Rangos para COLONIZACIÓN por Tratamiento\_ General.

## RESUMEN

Los biofertilizantes tienen origen biológico. Estos incluyen microorganismos promotores de crecimiento vegetal y compuestos orgánicos que actúan directa o indirectamente en el sistema radical de las plantas. En el suelo existen microorganismos que establecen simbiosis con especies vegetales ofreciendo a las plantas múltiples beneficios tales como: aumentar la asimilación de nutrientes y protección contra estrés biótico y abiótico. Algunos ejemplos de estos microorganismos son: los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y bacterias del género *Pseudomonas* spp. Los biofertilizantes más comunes están desarrollados en base a microorganismos; sin embargo, también pueden ser derivados de ellos o incluso derivados orgánicos como los nanotubos de carbono. Recientemente se ha demostrado que los nanotubos pueden tener algunos efectos en el desarrollo vegetal. La aplicación de biofertilizantes y otros promotores de crecimiento en campos agrícolas surge como una alternativa agroecológica para eficientizar producciones y reducir el uso de agroquímicos. Sin embargo, existe poca información sobre el efecto de microorganismos cuando son combinados con otros promotores del crecimiento vegetal y su relación con la fertilización mineral. En esta investigación se evaluó el efecto de tres biofertilizantes: hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (*Rhizophagus irregularis*), promotores de crecimiento obtenidos de *Pseudomonas* spp. (PC) y nanotubos de carbono (N) sobre el desarrollo de la planta de cebada en tres escenarios de fertilización fosforada (0mg, 50mg y 100mg). Así mismo se determinó el efecto de nanotubos de carbono y exudados de *Pseudomonas* spp. en diferentes escenarios de fertilización fosforada sobre la colonización de HMA. Se midieron variables (peso seco follaje, peso seco raíz, alturas, colonización de HMA) para evaluar el desempeño vegetal. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de tres vías (F1: HMA, F2: nanotubos y F3: promotor de crecimiento) y las diferencias entre tratamientos mediante un test de significancia de LSD con una  $p \leq 0.05$  con el programa Statgraphics Centurion XVI. En general se observó un incremento en el desarrollo de la cebada cuando se combinaron los biofertilizantes (HMA-PC, HMA-N, PC-N, HMA-PC-N) y agregó alta fertilización fosforada (100mg). En cuanto a los hongos micorrícicos arbusculares se mostró que cuando el fósforo es escaso incrementa la colonización y que los otros biofertilizantes no promueven ni afectan el desarrollo de HMA. En conclusión, el uso de biofertilizantes combinados resulta una opción viable para eficientizar el uso de recursos agroquímicos en el cultivo de cebada.

## ABSTRACT

Biofertilizers have biological origin. These include plant growth promoting microorganisms and organic compounds that act directly or indirectly on the root system of plants. There are microorganisms in the soil that establish a symbiosis with vegetal species offering to the plants multiple benefits such as: raising the assimilation of nutrients and protection against biotic and abiotic stress. Some examples of these microorganisms are: arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and the genus bacteria *Pseudomonas* spp. The most common biofertilizers are developed based on microorganisms; however, they can be derived from them or even organic derives like the carbon nanotubes. Recently, it has been shown that the nanotubes could have some effects in the plant development. The application of biofertilizers and other vegetal growth promote microorganisms in agricultural fields comes as an agroecological alternative to provide a more efficient production and to reduce the use of agrochemicals. However, there is few information about the effect on microorganisms when they are combined with other growth promote microorganisms and its relation with the mineral fertilization. On this research the effect on three bio-fertilizers have been evaluated: arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (*Rhizophagus irregularis*) growth promoters obtained from the *Pseudomonas* spp. (PC) and carbon nanotubes (N) on the development of Malting Barley in three different scenarios of phosphorus fertilization (0mg, 50mg, 100mg). In addition, the effect of carbon nanotubes and exudated *Pseudomonas* spp. was determined on different scenarios of phosphorus fertilization on the AMF colonization to evaluate the vegetable performance. The results were analyzed by three ways variance analysis (F1: AMF, F2: nanotubes and F3: growth promoters) and the differences between treatments through a Least Significant Difference test (LSD) with a  $p \leq 0.05$  using the program Statgraphics Centurion XVI. In general an increase was observed in the development of the Malting Barley when a high phosphorus fertilization (100mg) was added combined with the biofertilizers (HMA-PC, HMA-N, PC-N, HMA-PC-N). In respect of the arbuscular mycorrhizal fungi, it was shown that when the phosphorus is limited there is an increase in the colonization and the other biofertilizers do not promote nor affect the development of AMF. In conclusion, the use of combined bio-fertilizers results in a viable option to make more efficient the use of agrochemical resources in the barley cultivation.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas terrestres dependen en gran medida de la actividad microbiana del suelo y de los ciclos bioquímicos de los nutrientes. La complejidad del sistema de suelo se determina por las diversas interacciones entre su física, química, componentes biológicos y condiciones ambientales. El equilibrio que esta provee determina la calidad y salud del suelo (López, 2005).

Todas estas interacciones se presentan en el espacio físico de tierra que envuelve y rodea las raíces, el cual llamamos rizósfera. El entendimiento sobre las interacciones biológicas del suelo en cultivos da a la agricultura beneficios basados en un mejor uso de recursos relacionados a la nutrición de las plantas. Acercándola hacia un enfoque más sustentable de la nutrición vegetal (Pedraza, 2010).

Actualmente los sistemas productivos intensivos utilizan fertilizantes agroquímicos como fuente de nutrientes para poder mantener las elevadas producciones. El uso de fertilizantes trae consecuencias negativas hacia la calidad y salud del suelo.

Se ha puesto, en evidencia que microorganismos benéficos del suelo tienen la capacidad de incrementar la asimilación de los nutrientes del suelo y así promover el desarrollo vegetal (Salamone, 2012). Los microorganismos benéficos surgen, entonces, como una alternativa para eficientizar los procesos de producción en sistemas agrícolas.

Los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) han sido asociados a cultivos de interés como el maíz y el sorgo mostrando resultados positivos en la producción (Carranco, 2010). Las bacterias *Pseudomonas* spp. también han mostrado promoción del crecimiento para maíz y gramíneas (Loredo, 2004). Otro biofertilizante no vivo de derivación orgánica son los nanotubos de carbono. Estos han mostrado efectos positivos en la germinación y la producción de flor y fruto de plantas de tomate (Khodakovskaya, 2012).

Este trabajo de investigación busca alternativas en cuanto a la sustitución parcial de fertilizantes de síntesis química por fertilizantes biológicos que no presentan riesgos para el ambiente. Existe evidencia que indica que los biofertilizantes pueden incrementar el rendimiento en cultivos, sin embargo, son necesarias más investigaciones que puedan contribuir al entendimiento de estas prácticas y fomentar su implementación en el sector agrícola.

En México la cebada representa un cultivo de interés principalmente por la industria cervecera la cual requiere de la cebada maltera. En la presente investigación se expone cuál es el efecto de tres diferentes biofertilizantes solos y en combinación en el desarrollo de la planta de cebada, en condiciones contrastantes de fertilización fosforada.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Rizósfera**

La rizósfera es la zona del suelo influenciada por la presencia y actividad de la raíz (Hinsinger, 1998). El conjunto de interacciones entre suelo, raíces y microorganismos da lugar al desarrollo de un ambiente dinámico conocido como rizósfera, donde una variedad de formas microbianas pueden desarrollarse activamente y en equilibrio (Pedraza, 2010). Según esta definición la extensión espacial de la rizósfera puede variar entre 1-2 mm desde la raíz cuando se trata de nutrientes de movilidad limitada como el fósforo, extendiéndose a varios centímetros en casos de escasez de agua o nutrientes y hasta decenas de centímetros con los compuestos volátiles que liberan las raíces (Darrah, 1993).

La rizósfera constituye uno de esos puntos sensibles a la respuesta de los cultivos agrícolas porque concentra una gran actividad metabólica con intercambio de nutrientes entre la planta y el suelo. Dicha actividad es mediada por la acción e interacción de plantas y microorganismos del suelo (Pedraza, 2010).

De acuerdo con sus funciones, los microorganismos rizosféricos se han agrupado en: *i*- degradadores de residuos orgánicos, *ii*- bacterias promotoras del crecimiento vegetal, y *iii*- hongos y bacterias antagonistas de patógenos de raíces (Pedraza, 2010).

### **2.2. Biofertilizantes**

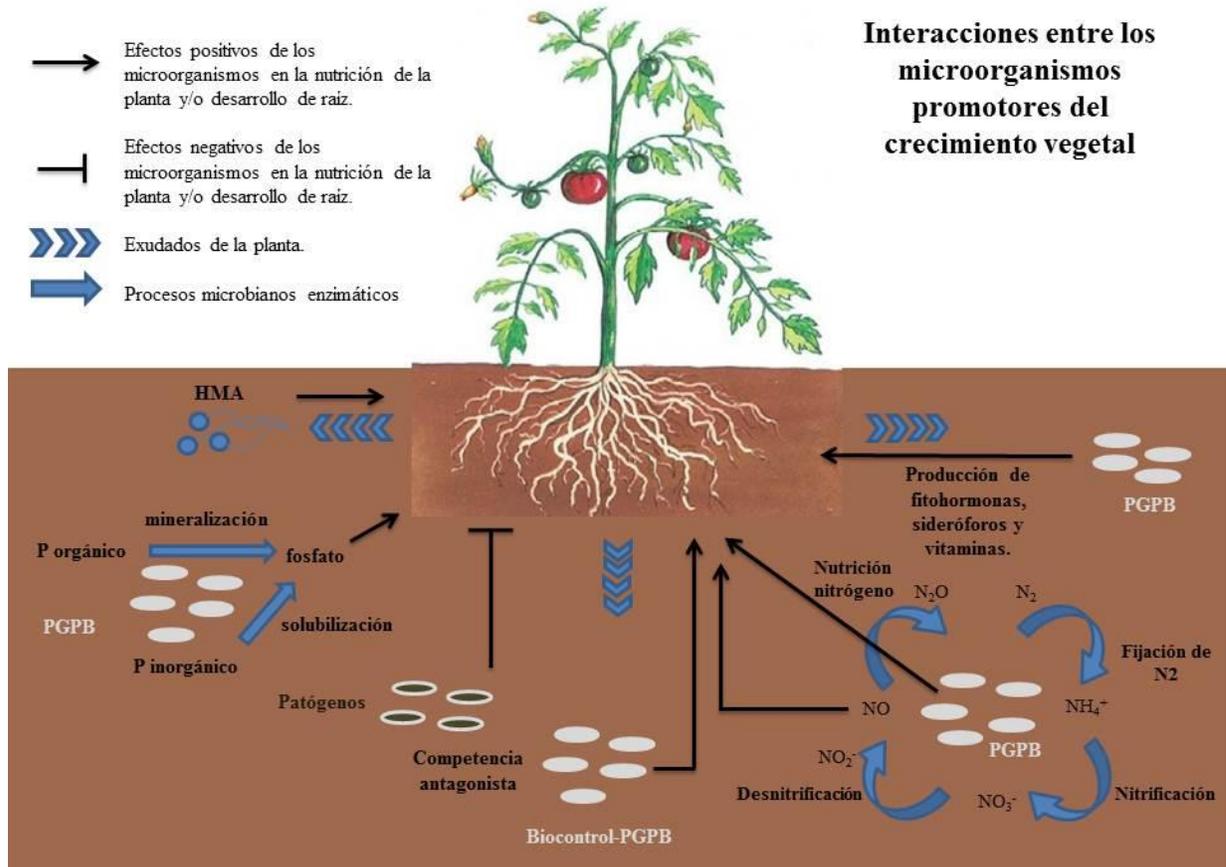
Se considera como biofertilizante al grupo de inoculantes en base a microorganismos del suelo que se asocian directa o indirectamente al sistema radical de las plantas.

Los biofertilizantes favorecen la nutrición de las plantas y modifican su desarrollo; además son productores de hormonas de crecimiento que estimulan funciones de absorción o fijación de nutrientes en las raíces (Garza, 2003). Esto se debe a una relación simbiótica donde la planta provee el medio para el desarrollo de los microorganismos y estos, a su vez, benefician a la planta facilitando la disponibilidad de ciertos nutrientes y ofreciendo protección contra factores externos (Bojorquez, 2010). Los biofertilizantes más comunes

están desarrollados en base a microorganismos; sin embargo, también pueden ser derivados de ellos como los metabolitos de algunas bacterias o incluso derivados orgánicos como los nanotubos de carbono.

Se ha puesto en evidencia que varias etapas del ciclado de nutrientes en el suelo se dan exclusivamente por procesos microbianos. Así, la degradación de polímeros carbonados, la producción y el consumo de metano, la fijación de nitrógeno o la oxidación de amonio a nitrito y posteriormente a nitrato, son procesos biológicos llevados a cabo sólo por microorganismos (Loredo, 2004).

Los microorganismos utilizados en los biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos: El primer grupo incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al estrés por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas. El segundo grupo incluye microorganismos capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro ocasionados por microorganismos patógenos (Bashan, 1998). Bojórquez (2010) menciona que existen microorganismos que pueden estar en ambos grupos como los HMA que, además de promover el crecimiento de la planta, inhiben los efectos de microorganismos patógenos.



**Fig. 1.** Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (efectos positivos y negativos) asociados con el suelo y los microorganismos de la rizósfera, modificado de Richardson et al., 2009.

### 2.2.1. Uso de biofertilizantes en la agricultura

La agricultura intensiva actual emplea grandes cantidades de insumos para su producción. El uso de biofertilizantes se ha desarrollado como una alternativa para favorecer la nutrición de las plantas por medios biológicos y tiene como finalidad incrementar la productividad de los cultivos, eficientizando la fertilización química y reduciendo la contaminación de los suelos, cuerpos de agua y atmósfera (Aguirre, 2000; Bojórquez, 2010).

Uno de estos insumos utilizados en la agricultura es el fósforo. El fósforo es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas. En muchas regiones del planeta, el fósforo del suelo se presenta como un factor limitante en la producción agrícola. Se estima que cada año se aplican aproximadamente 30 millones de toneladas de insumos fosforados ( $P_2O_5$ ) (International Fertilizer Industry Association, 2001). Se ha puesto en evidencia el efecto benéfico de biofertilizantes como los HMA sobre cultivos de interés, eficientizando el uso de insumos fosforados (Carranco, 2010; Loredó, 2004).

### **2.3. Hongos micorrícicos**

#### **2.3.1. Generalidades**

Se conoce como micorriza a la simbiosis que se desarrolla entre un hongo micorrícico y las raíces de la mayoría (90%) de las especies de plantas de la tierra (Smith y Read, 2008). Esta relación se presenta cuando el hongo coloniza la parte radicular de la planta y desarrolla estructuras funcionales (hifas, arbuscúlos, vesículas, micelio externo, ovillos, redes de hifas) dependiendo del grupo de hongos micorrícicos (Bücking et al., 2012).

Las micorrizas pueden establecer una relación mutualista debido a los beneficios que reciben ambos simbioses. Mientras que los hongos tienen un espacio óptimo para su desarrollo y reciben carbono proveniente de la fotosíntesis, las plantas a su vez son provistas de nutrientes del suelo, principalmente fósforo (Hodge et al., 2010). Otro beneficio que los hongos micorrícicos brindan a la planta es la protección contra estrés biótico causado por patógenos y estrés abiótico causado por sequías, salinidad, metales pesados o contaminación (Barea et al., 2005). Los hongos micorrícicos (HM) pueden mejorar la estructura del suelo a través de la formación de micro agregados necesarios para un buen estado nutricional e hídrico del suelo (Bedini et al., 2009; Linderman, 2000; Pedraza, 2010; Smith y Read, 2008).

Los HM se encuentran en muchos ambientes y su éxito ecológico se refleja por un alto grado de diversidad en las habilidades genéticas y fisiológicas de los hongos endófitos (Bonfante, 2010).

### 2.3.2. Tipos de asociación micorrícica

La categorización más aceptada es la propuesta por Smith y Read (2008), quienes propusieron siete tipos de asociaciones micorrícicas en base al tipo de microtrofia de las raíces de las plantas, la taxonomía de la planta y del hongo. De acuerdo a lo anterior las categorías son: Arbuscular, Ecto, Orquideoide, Arbutoide, Ectendomicorriza, Monotropoide y Ericoide (Cuadro 1).

**Tabla 1. Características generales de los hongos micorrícicos tomada de Smith y Read (2008).**

Característica	Tipo de micorriza						
	Arbuscular	Ecto	Ectendo	Arbutoide	Monotropoide	Ericoide	Orquideoide
Hongo septado	-	+	+	+	+	+	+
Hongo aseptado	+	-	-	-	-	-	-
Colonización intracelular	+	-	+	+	+	+	+
Red de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Clasificación taxonómica	Glomeromicota	Basidiomicetes/ Ascomicetes	Basidiomicetes/ Ascomicetes	Basidiomicetes	Basidiomicetes	Ascomicetes	Basidiomicetes
Taxa que coloniza	Bryophyta, Pteridophyta Gymnospermae Angiospermae. Angiospermae.	Gymnospermae Angiospermae	Gymnospermae Angiospermae	Ericales	Monotropoideae	Ericales Bryophyta	Orchidales

Dependiendo si la formación de estructuras del hongo se presenta de manera intra o extracelular se pueden dividir en 2 grupos generales: ectomicorrizas y endomicorrizas. En las ectomicorrizas, que se caracterizan por establecer simbiosis en árboles y arbustos, las hifas se desarrollan en la zona extracelular, induciendo cambios importantes en la morfogénesis de la raíz. Su presencia sólo conduce a modificaciones sutiles en células epidérmicas o corticales. En las endomicorrizas, en las que se pueden incluir, arbusculares, ericoide y orquideoide, las hifas penetran en las células de la raíz para establecer una simbiosis intracelular con independencia de la planta huésped (Bonfante, 2001; Bücking et al., 2012).

### **2.3.3. Hongos micorrícicos arbusculares**

Todos los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) han sido clasificados dentro el phylum Glomeromycota, el cual está compuesto por aproximadamente 150 especies. Los HMA están clasificados en tres clases (Archaeosporomycetes, Glomeromycetes, y Paraglomeromycetes), y cinco ordenes: Archaeosporales, Diversisporales, Gigasporales, Glomerales y Paraglomerales (Bücking et al., 2012).

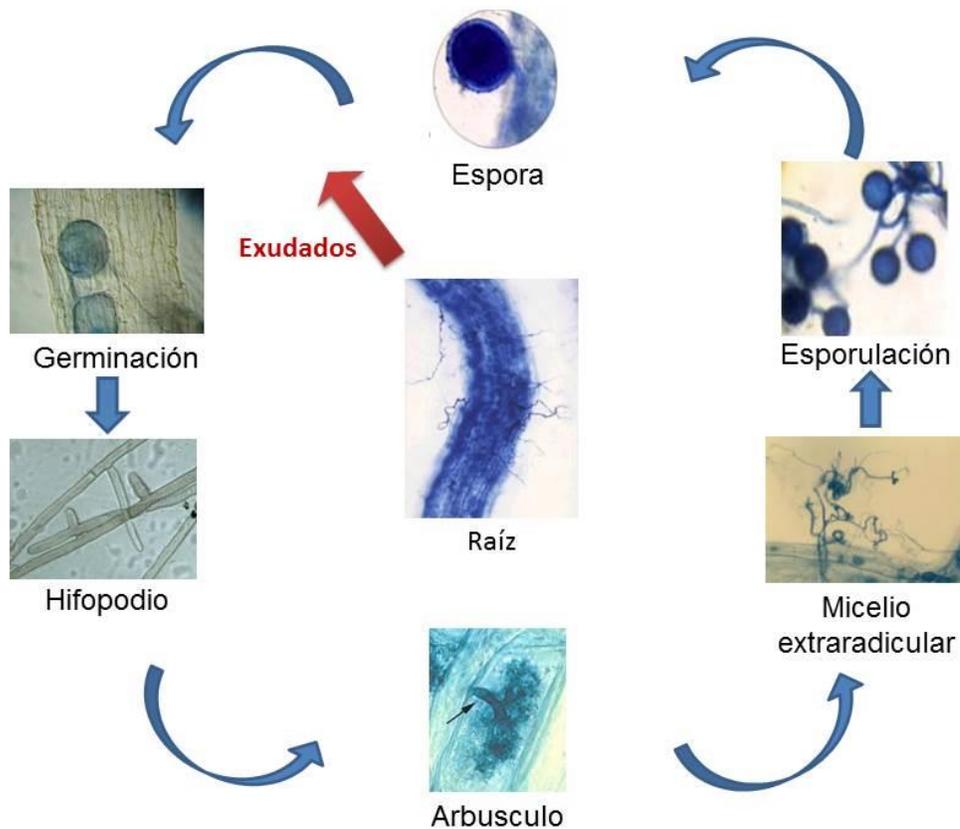
Los hongos micorrícicos arbusculares son el grupo de HM con mayor distribución. Se encuentran en la mayoría de los ecosistemas y establecen simbiosis con cerca del 80 % de las plantas vasculares colonizando un gran número de especies de gimnospermas, angiospermas y pteridófitas (Smith y Read, 2008).

La colonización por micorrizas arbusculares, da lugar al desarrollo de hifopodio en la superficie de la raíz, hifas inter e intra celulares, “coils” y estructuras características ramificadas llamadas arbusculos que se desarrollan dentro de las células corticales (Bonfante, 2010). Los arbusculos son hifas que se dividen dicotómicamente. Estos son invaginados por la membrana plasmática de las células corticales y presentan periodos de vida cortos, mientras que las vesículas son estructuras de almacenamiento que se forman en la parte terminal de las hifas y son más persistentes que los arbusculos o las hifas (Barker *et al.*, 1998).

### **2.3.4. Ciclo de vida de los HMA y las diferentes etapas a lo largo del desarrollo de HMA**

El ciclo inicia con la germinación de la spora (Fig. 2). Las esporas son capaces de germinar sin un hospedero, sin embargo las esporas responden con un incremento en actividad metabólica hacia los exudados de raíz. Es decir que los exudados de las raíces favorecen la germinación de las esporas de HMA (Bücking, 2012).

En la superficie de la raíz hospedera, los HMA actúan de forma apresoria, desarrollando el hifopodio. La hifa que emerge del hifopodio penetra la raíz y atraviesa las células de la raíz hasta llegar al cortex. En el cortex, la hifa entra al apoplasto y crece lateralmente a lo largo de los ejes de la raíz para luego penetrar en las células corticales interiores.



**Fig. 2.** Ciclo de vida de un hongo micorrízico arbuscular y las distintas etapas en su desarrollo, modificado de Bücking et al. 2012.

El micelio que se forma dentro de la raíz conocido como micelio intraradical (MIR) difiere morfológicamente y funcionalmente del micelio extraradicular (MER), es decir, el micelio que crece en el suelo. El MER absorbe nutrientes del suelo y transporta estos nutrientes a la raíz hospedera. Por otro lado, el MIR libera nutrientes en el apoplasto interfacial y lo intercambia por carbono del hoperado. El hongo usa estos recursos de carbono para mantener y aumentar la longitud de MER, para metabolismo celular, y para el desarrollo de esporas, las cuales permiten el inicio de colonización para una siguiente generación de plantas hospederas (Fig. 2.) (Bücking, 2012).

## **2.4. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal**

### **2.4.1. Generalidades**

Algunas bacterias del suelo presentan relaciones de simbiosis con plantas y son consideradas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPB (por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Bacteria), debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas (Richardson, 2009).

Existen diversos mecanismos de las PGPB para promover el crecimiento de las plantas. Los que se mencionan con más frecuencia en la literatura son: fijación de nitrógeno, producción de sustancias reguladoras del crecimiento y solubilización de minerales.

Además de mecanismos de protección como la producción de compuestos sideróforos que controlan la disponibilidad del Fe en la rizósfera, alteraciones en el potencial de la membrana de la raíz, inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos antagónicos e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Fig. 1.) (Loredo, 2004).

Las PGPB tienen capacidad para sintetizar sustancias reguladoras del crecimiento (fitohormonas). Estas sustancias son metabolitos producidos de forma endógena por las plantas, que afectan diversos procesos de las mismas, a concentraciones más bajas de las que presentan nutrimentos o vitaminas (Bojórquez, 2010). El término “reguladores del crecimiento de las plantas” es usado por la industria de agroquímicos para nombrar a los compuestos sintéticos que tienen propiedades para regular el crecimiento de las plantas. En general, este término se utiliza cuando las hormonas de las plantas son producidas por microorganismos de la rizósfera (Arshad y Frankenberger, 1998).

Las PGPB se asocian en el nicho rizosférico con plantas de interés agronómico y en ciertos casos producen efectos benéficos directos sobre su crecimiento y nutrición tanto nitrogenada como fosforada. Así se constituyen en una alternativa económica y ecológica para aumentar la producción de alimentos (Bashan et al., 2004).

#### **2.4.2. Tipos de bacterias promotoras del crecimiento vegetal**

Las relaciones PGPB-hospedero pueden dividirse en dos categorías principales: rizosféricas y endófitas (Verma, 2010).

Las PGPB rizosféricas son bacterias de vida libre donde la actividad se presenta en la rizósfera. “Estos incluyen géneros tales como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Caulobacter*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Agrobacterium*, *Hyphomicrobium* y bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter* y *Azospirillum*)” (Verma, 2010,).

Las PGPB endófitas son aquellas que mantienen una asociación simbiótica muy marcada con el hospedero debido a que la colonización se establece dentro de las células de la raíz, llegando a formar estructuras llamadas nódulos. Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium*, pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, tienen esta capacidad de invadir los sistemas de raíces de las plantas y desarrollar nódulos en raíces (Martínez Romero y Wang, 2000).

Las PGPB también pueden diferenciarse por su metabolismo y se las puede clasificar en: aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Loredo, 2004).

#### **2.4.3. Rizobacterias del género *Pseudomonas* spp.**

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativo de vida libre. Tienen características estrictamente aerobias, flagelos mono-multítrico, metabolismo fermentativo negativo, catalasas positivas, la mayoría oxidasa positiva (Leisinger, 1979).

Las especies de *Pseudomonas* contienen plásmidos que son principalmente catabólicos, con genes que codifican para enzimas involucradas en la degradación de una amplia variedad de compuestos que generalmente no son metabolizados por otros grupo de bacterias (Alanís *et al.*, 2004).

Gracias a su gran capacidad metabólica y de resistencia, las *Pseudomonas* cuentan con potencial para múltiples aplicaciones biotecnológicas entre las que destacan procesos como producción de metabolitos y biotransformaciones enzimáticas, biodegradación y biorremediación de suelos contaminados con petróleo y pesticidas.

#### **2.4.4. Mecanismos de promoción del crecimiento en plantas asociado a *Pseudomonas* spp.**

La producción de metabolitos atribuidos al grupo bacteriano del género *Pseudomonas*, brindan ciertos beneficios que pueden resumirse en una acción de biocontrol a través de: la secreción de antibióticos (i.e. pirrolnitrina, pioluteorina), la inducción de resistencia sistémica en la planta (Ferraris, 2011); el agotamiento de recursos esenciales para el crecimiento de hongos y bacterias patogénicas por la producción de quelantes de hierro o sideróforos (i.e pioverdina) (Alanís *et al.* 2004);

La promoción del crecimiento se debe también a la secreción de sustancias inductoras como: fitohormonas, auxinas y giberelinas; y la solubilización de nutrientes debido a su capacidad de producir enzimas fosfatasa, ácidos orgánicos (i.e. ácido glucónico, cítrico) e inorgánicos (i.e. ácido sulfhídrico, nítrico, carbónico) (Ferraris, 2011).

Además se les atribuye la producción de exopolisacáridos a cepas como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia* (Alanís *et al.*, 2004). Los polisacáridos actúan como elicitores de resistencia (Resistencia Sistémica Adquirida), es decir, activan mecanismos naturales de los vegetales que los protegen fisiológicamente de estrés abióticos e incluso de patógenos (Dotor, 2014).

### **2.5. Nanotubos de carbono**

#### **2.5.1. Generalidades**

Las nanopartículas de ingeniería (ENPs, por sus siglas en inglés Engineered Nanoparticles) son materiales con dimensiones entre 1 nm y 100 nm (ASTM, 2006). Las ENPs más comunes son las nanopartículas carbonáceas y son principalmente fullerenos y nanotubos.

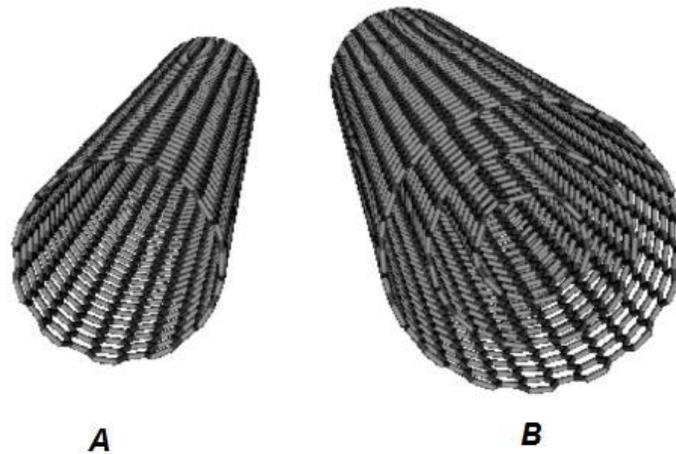
Un nanotubo de carbono es un enrejado con forma de nido de abeja enrollada sobre sí misma, con un diámetro del orden de nanómetros y longitud de hasta varios micrómetros (Ma, 2010).

Los nanotubos de carbonoson materiales que, debido a sus propiedades físicas, eléctricas y mecánicas están siendo utilizados en un gran número de aplicaciones tecnológicas. Su producción a gran escala, bajo costo y alta calidad abren nuevos campos para la producción y aplicación de nanotubos de carbono. Típicamente, estos son formados a partir de hidrocarburos derivados del petróleo tales como el monóxido de carbono, metano, acetileno, benceno, alcohol, etc. (Díaz, 2008). Sin embargo, también se pueden formar a

partir de hidrocarburos de origen botánico como el alcanfor o el aguarrás. El aguarrás ( $C_{10}H_{16}$ ), es una sustancia obtenida de la destilación de la resina de árbol, principalmente de pinos. El aguarrás es una mezcla de terpenos; principalmente alfa pineno y beta pineno (Díaz, 2008).

### 2.5.2. Tipos de nanotubos de carbono

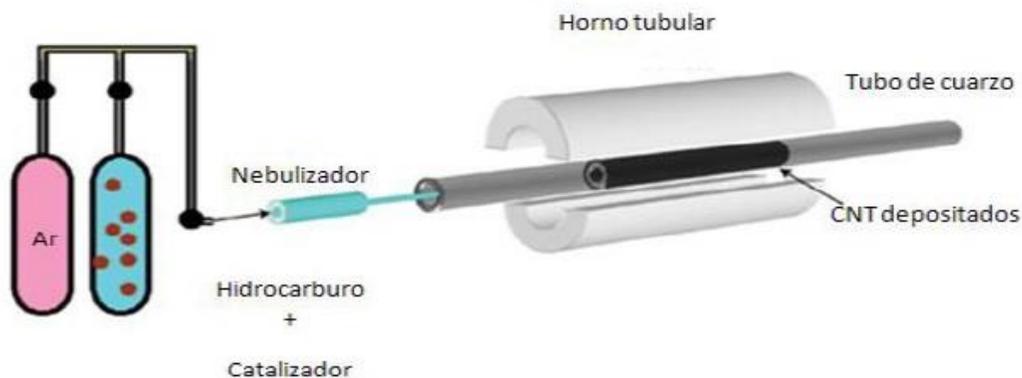
Hay dos tipos de nanotubos de carbono: los de pared sencilla (SWCNTs por sus siglas en inglés) y los de pared múltiple MWCNTSs. Los primeros tienen un diámetro de alrededor de 1nm, una longitud que puede ser órdenes de magnitud mas grande y tienen un esqueleto de átomos de carbón en arreglo hexagonal. Los SWCNTs se pueden visualizar como una lámina de grafito enrollada en sí misma. Los MWCNTSs consisten en múltiples tubos de carbono arreglados concéntricamente. Hay dos modelos que sirven para describir la estructura de los nanotubos de carbono. El primero es el modelo Parchment, donde una única hoja de grafito es enrollada en sí misma (Fig. 3. A). El segundo modelo es el de la muñeca rusa, láminas de grafito ordenadas en forma de cilindros concéntricos (Fig. 3. B) (Díaz, 2008).



**Fig. 3. A)** Representación de la estructura de un nanotubo de pared sencilla (SWCNT) **B)** Representación de la estructura de un nanotubo de pared múltiple (MWCNT) (IBMC, 2014).

### 2.5.3. Síntesis de nanotubos de carbono por el método spray pirolisis

El método spray pirolisis es un método simple y barato en comparación con otros métodos para la síntesis de nanotubos de carbono. La síntesis de MWCNTs involucra la nebulización y rocío de una solución hidrocarburo/catalizador en un horno a una temperatura entre 700-1000°C y con un flujo de gas inerte. En el método de spray pirolisis para la síntesis de nanotubos de carbono existe formación de aglomerados de partículas de Fe en las paredes de sustrato y esos aglomerados actúan como trampas de carbono (Fig. 4.). Al principio de la formación de los nanotubos, los aglomerados son rodeados por carbono. Para el crecimiento de los nanotubos el carbono es incorporado hasta la parte superior del tubo donde las partículas de Fe permanecen. Estas nano partículas de Fe difunden las nuevas especies de carbono que se incorporan al nanotubo en direcciones radiales y axiales, conformando así los nanotubos de carbono de capa múltiple (Díaz, 2008).



**Fig. 4.** Metodo de síntesis de nanotubos de carbono por spray pirolisis tomada de Díaz (2008).

### 2.5.4. Uso de nanotubos de carbono en agricultura

Al ser una tecnología reciente, los nanotubos no cuentan con mucha literatura acerca de los efectos que pueden llegar a tener en especies vegetales. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la aplicación de nanotubos de carbono en semillas de cultivos de maíz, soya y cebada puede acelerar la germinación así como activar el crecimiento en plántulas (Khodakovskaya et al., 2013).

Lo que demuestra el importante potencial de los nanotubos de carbono como reguladores de la germinación y el crecimiento de las plantas (Khodakovskaya et al., 2009; Lahiani et al., 2013).

## 2.6. Cebada (*Hordeum vulgare*)

La cebada pertenece al género *Hordeum* en la familia *Poaceae*. Pertenece a la tribu *Triticeae* que es un grupo de plantas que agrupa varios cereales y forrajes de importancia económica, así como cerca de 350 especies silvestres (Box, 2008).

Es poco exigente en cuanto al clima y gracias a ello su cultivo se encuentra muy extendido. Crece mejor en climas frescos y moderadamente secos. Requiere poca acumulación de calor para madurar y por ello puede sembrarse en diferentes altitudes y zonas geográficas; está adaptada a muchas condiciones ambientales (Box, 2008). En las zonas templadas y frías alcanza entre setenta centímetros hasta más de un metro de altura (SAGARPA, 2014).

Su rango óptimo de crecimiento se encuentra entre los 15-30°C, sin embargo puede tolerar temperaturas altas si la humedad relativa es baja. Comparado con otros cereales la cebada tiene una mayor tolerancia al estrés hídrico (Stanca et al. 1992). Tiene cierta sensibilidad a suelos ácidos y a presencia de contaminantes como el aluminio y boro (Van Gool y Vernon, 2006). En cuanto a los factores de estrés biótico la cebada muestra una mayor competitividad con malezas que otras gramíneas, es sensible a patógenos como virus, hongos o nematodos, aunque también se han demostrado relaciones simbióticas con bacterias y hongos benéficos del suelo (Box, 2008). Es importante aclarar que cualquier tipo de estrés afecta el desarrollo de la planta deteriorando consigo las producciones agrícolas.

### 2.6.1. Panorama nacional del cultivo de cebada

En México, el cultivo de la cebada se orienta básicamente a la elaboración de malta para la producción de cerveza. La malta se usa también para la fabricación de productos alcohólicos destilados como el whisky y productos alimenticios.

**Tabla 2.** Producción anual de cebada destinada a forraje, grano y semilla en México 2010-2013.

Año	Sup. Sembrada (ha)	Sup. Cosechada (ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/ha)
2010	341,811.91	299,356.73	1,152,911.06	24.69
2011	372,849.09	250,228.41	886,124.07	21.12
2012	379,337.28	368,823.6	1,539,913.14	22.02
2013	355,782.07	330,633.62	1,008,737.56	19.47

Elaborado con datos de SIAP con información de las Delegaciones de la SAGARPA, 2014.

La producción nacional de cebada se desarrolla principalmente en la zona centro del país en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, México, Guanajuato, Puebla, Zacatecas, Michoacán y Querétaro. Durante el ciclo de primavera – verano, se produce el 75% de la producción nacional, donde aproximadamente el 99% se siembra bajo condiciones de temporal. En el ciclo de otoño – invierno, se produce el 25% restante, del cual, alrededor del 95% es bajo condiciones de riego (SAGARPA, 2002).

Las variedades de cebada sembradas en el país son: Adabella, Centinela, Cerro prieto, Esmeralda, Esperanza, Gabyota, Guanajuato y Puebla (Soria, 2013).

### **2.6.2. Panorama estatal del cultivo de cebada**

En el Estado de Michoacán, la cebada se siembra y se produce específicamente para ser utilizada por la industria maltera. Es importante aclarar que toda la semilla que se siembra en el altiplano mexicano se reproduce en Guanajuato y de aquí se distribuye a los estados que lo integran como son: Tlaxcala, Hidalgo, Puebla y Michoacán (SAGARPA, 2012).

La superficie del estado de Michoacán tiene un potencial para la siembra de cebada de aproximadamente 15,000 ha, de las cuáles solamente se establecen con este grano, aproximadamente 2,647 ha. La producción para el año 2009 fue de 12,560 toneladas lo que significa sólo el 1 % de la demanda de cebada por parte de la industria maltera nacional. Los rendimientos por hectárea fluctúan entre 3 toneladas/ha hasta 7.5 toneladas/ ha en el bajío durante el ciclo otoño-invierno 2010/2011 (SAGARPA, 2012).

La región del estado de Michoacán que más cebada produce es la que se encuentra dentro del área de influencia del Distrito de Desarrollo Rural Núm 090, La Piedad (SAGARPA, 2012). Las semillas que se utilizan son de las variedades: Adabella, Esperanza, Armida y Alina. Las variedades: Cerro Prieto, Centinela, y Gaviota, se han dejado de usar debido a la baja eficiencia en la productividad.

### **2.6.3. Uso de biofertilizantes en *Hordeum vulgare***

Los hongos micorrícicos arbusculares han sido asociados con la cebada. Dichas simbiosis pueden incrementar la asimilación de nutrientes y ofrecen protección contra patógenos y estrés abiótico (Box, 2008).

Las principales especies bacterianas asociadas con gramíneas son *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *A. amazonense*; *Herbaspirillum seropedicae* y *Acetobacter diazotrophicus*; *Enterobacter agglomeran*, *E. cloacae*, *Bacillus azotofixans*, *B. polymyxa* y *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella sp.* y bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Loredo, 2004).

Algunos ensayos realizados con *Pseudomonas fluorescens* en cebada cervecera mostraron un incremento en el rendimiento en aquellos tratamientos donde se aportó fertilización, principalmente fosforada (Ferraris, 2001). En otros estudios *Pseudomonas aeruginosa*

7NSK también incrementó el rendimiento de la cebada, además de maíz y trigo (Loredo, 2004).

Lo anterior nos permite inferir que la inoculación de cebada cervecera con bacterias del genero *Pseudomonas* y hongos micorrícicos arbusculares se presentan como prácticas alternativas favorables con potencial de incrementar la producción de biomasa y los rendimientos agrícolas.

### **3. HIPÓTESIS**

La inoculación de *Rhizophagus irregularis*, promotores de crecimiento obtenidos de *Pseudomonas spp.* Y nanotubos de carbono tienen un efecto benéfico en el desempeño vegetal de la cebada (*Hordeum vulgare*).

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar efecto de la aplicación de HMA (*Rhizophagus irregularis*), promotores de crecimiento obtenidos de *Pseudomonas spp.* Y nanotubos de carbono bajo diferentes escenarios de fertilización fosforada sobre desarrollo vegetal de la cebada (*Hordeum vulgare*).

#### **4.1. Objetivos particulares**

- Evaluar la relación entre los promotores de crecimiento en diferentes escenarios de fertilización fosforada sobre el desempeño vegetal de *Hordeum vulgare*.
- Determinar el efecto de nanotubos de carbono y exudados de *Pseudomonas spp.* En diferentes escenarios de fertilización fosforada sobre la colonización de *Rhizophagus irregularis*.

### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1. Materiales biológicos**

Se utilizó una cepa comercial de *Rhizophagus irregularis*, antes llamado *Glomus intraradices*, suministrada por el Corporativo de Desarrollo Sustentable S.A. de C.V. COSUSTENTA; un promotor del crecimiento obtenido a partir de *Pseudomonas spp.* Y nanotubos de carbono de capa múltiple sintetizados a partir de productos naturales suministrados por la facultad de ingeniería química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Se utilizó la variedad de cebada Adabella que se siembra en la región de Morelia-Queréndaro.

## 5.2. Diseño experimental

El experimento se realizó con un diseño en bloques completos al azar con siete tratamientos con biofertilizantes y un testigo. Los tratamientos mencionados se evaluaron en tres escenarios de fertilización aplicando macro y micro nutrientes variando solo la concentración de fósforo (0 mg, 50 mg, 100 mg). Sin embargo cada dosis de fertilización se evaluó como un experimento independiente. Cada tratamiento tuvo 6 repeticiones en cada uno de los tres niveles de fertilización (Cuadro 3).

**Tabla 3.** Diseño experimental

	Factor	Nivel	Total
F1	HMA	CON/SIN	2
F2	Promotor del crecimiento	CON/SIN	2
F3	Nanotubos	CON/SIN	2
FERTI	Aplicación de fosforo	0, 50 Y 100 mg/P	3
Repeticiones	Repeticiones	6	6
Total			144

**Tabla 4.** Tratamientos

Tratamientos
Testigo
A:HMA
B:Nanotubos
C:Promotor
<b>Interacciones</b>
AB: HMA N
AC: HMA PC
BC: N PC
ABC: HMA PC N

### 5.2.1. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de tres vías (F1: HMA, F2: nanotubos y F3: promotor de crecimiento) y las diferencias entre tratamientos mediante un test de significancia de LSD con una  $p \leq 0.05$  con el programa Statgraphics Centurion XV.I.

Para evaluar los porcentajes de colonización los valores fueron transformados mediante la función arco seno.

### 5.3. Siembra e inoculación de tratamientos

Se sembraron 3 semillas de la variedad de cebada Adabella en cada maceta y se inocularon con los distintos biofertilizantes como se indica en el cuadro 3. La inoculación se realizó directamente en el sustrato en el espacio donde se sembró la semilla con el fin de que las primeras raíces hicieran contacto con los inoculantes. En los tratamientos combinados se inocularon los diferentes biofertilizantes al mismo tiempo.

**Tabla 5.** Inoculación de semillas con biofertilizantes

<b>HMA</b>	<b>Promotor de crecimiento (exudados <i>Pseudomonas</i>)</b>	<b>Nanotubos de carbono</b>
+/-100 esporas/semilla	0.5 ml/semilla	20 Micro litros/semilla

Es necesario hacer énfasis en que se colocaron tres semillas por maceta por lo que los valores de la inoculación (Cuadro 4) fueron el triple considerando a la maceta como unidad experimental.

### 5.4. Condiciones, establecimiento y crecimiento de plantas

Previo al montaje se preparó el sustrato y se lavaron macetas de 1.5 litros. El sustrato consistió en una mezcla 1:1 de suelo-arena en base al peso seco. El suelo utilizado fue recolectado de una parcela del campo experimental del Centro Regional Universitario de Centro Oriente (CRUCO), Morelia, Michoacán. El sustrato fue esterilizado en autoclave a  $1.5 \text{ Kg/cm}^2$  de presión y a una temperatura de  $120^\circ\text{C}$  por una hora durante 2 días alternados.

El suelo según la carta edafológica 1:50,000 del INEGI se clasifica como un vertisol. Además, se realizaron estudios de laboratorio en el Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal del INIFAP donde se determinó que la capacidad de campo (CC) era del 37.5%, con un pH de 7.28. También se determinó que el suelo tenía un bajo contenido de fósforo pero alto contenido de materia orgánica y nitrógeno (Anexo 1). El experimento se realizó en condiciones de invernadero ubicado en el Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES), UNAM.

### **5.5. Estimación de la capacidad de campo del suelo para homogenizar el riego**

Las plantas se irrigaron al 80% de la capacidad de campo. Para ello se estimó la capacidad de campo del sustrato por el método gravimétrico, el cual consistió en pesar cinco muestras de 1000 y 50 g de sustrato saturado de agua para posteriormente secarlo en un horno de convección por 48 horas a 105°C (Llorca, 2006). El porcentaje de humedad del suelo se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de capacidad de campo (CC)} = \frac{(\text{Peso de suelo húmedo} - \text{Peso de suelo seco}) \times 100}{\text{Peso de suelo seco}}$$

## **5.6. Variables medidas**

### **5.6.1. Desempeño vegetal**

A lo largo del experimento se registró el desarrollo vegetal de las plantas. Se midieron las alturas cada semana y se realizaron 3 registros fotográficos a lo largo del experimento. Al cosechar se registró el peso fresco de cada planta. Posteriormente se secaron las plantas en horno a 70°C por 48 horas y se registraron los pesos secos de la parte aérea y radicular así como de las espigas para finalmente determinar el número de semillas por espiga por planta.

### 5.6.2. Estimación del porcentaje de colonización micorrízica

Para la evaluación de los HMA, se aleatorizaron las raíces con agua y se tomaron 2 gramos de raíces frescas para llevar a cabo la tinción mediante el procedimiento de Phillips y Hayman (1970) mencionado a continuación:

1. Sacar los 2 gramos de raíz y colocar en tubos falcon estándar de 50 ml.
2. Agregar entre 15-20 ml de hidróxido de potasio (KOH) al 10%.
3. Colocar los tubos falcon a baño maría de entre 75-80 °C por 25 minutos.
4. Enjuagar con agua corriente y agregar entre 7-10ml de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 2.5-3% por 25 minutos.
5. Enjuagar con agua corriente y agregar 5 ml de azul de tripano al 0.05%.
6. Colocar de nuevo en baño maría a 80°C por 4 minutos más.
7. Enjuagar con agua corriente y colocar en los contenedores originales. Agregar glicerol y mezclar para homogeneizar.

Se estimó la colonización de HMA mediante la técnica de la cuadrícula descrita por Giovannetti y Mosse (1980). Para ello se trazó una cuadrícula en una caja de Petri donde se vació cada muestra de raíces teñidas y se contabilizaron intersecciones de raíces con la cuadrícula y dentro de la intersección la presencia de hongos micorrícicos. El porcentaje de colonización se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Colon.} = \frac{(n \text{ intersecc. micorrizadas})}{(n \text{ intersecc. observadas})} \times 100$$

El número mínimo de intersecciones observadas son 100 (Giovannetti and Mosse, 1980). Para llevar a cabo el conteo de colonización se utilizó un aumento de 40x en un microscopio estereoscópico AmScope. Se presenta la colonización micorrízica como porcentaje de la presencia de HMA observados dentro de la raíz así como micelio externo. Para el análisis de colonización no fueron considerados los tratamientos que no fueron inoculados, sin embargo se verificó que no hubiera contaminación de HMA. Solo algunas muestras presentaron colonización inferior al 1% por lo que se puede suponer que no hubo un efecto significativo en las variables estudiadas.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Evaluación de la interacción entre biofertilizantes y fertilización fosforada en el desarrollo de HMA y cebada.

En esta sección se presentan los resultados de las variables de desempeño vegetal analizadas. El objetivo fue evaluar el efecto de tres biofertilizantes sobre el desarrollo de la planta de cebada en tres escenarios de fertilización fosforada. Los resultados se obtuvieron mediante un análisis de varianza de tres vías (F1: HMA, F2: nanotubos y F3: promotor de crecimiento) y las diferencias entre factores mediante un test de significancia de LSD con una  $p \leq 0.05$ .

**Tabla 6. Valores de p del análisis de varianza multifactorial de 3 vías para el desempeño vegetal bajo tres escenarios de fertilización fosforada y ocho biofertilizantes. \*= $p \leq 0.05$ , \*\*= $p \leq 0.01$ .**

	PESO SECO RAIZ			PESO SECO AEREO			RELACION RAIZ/TALLO		
	0mg/P	50mg/P	100mg/P	0mg/P	50mg/P	100mg/P	0mg/P	50mg/P	100mg/P
A:HMA	0.7373	**	0.4907	0.4193	0.1351	0.1852	0.4151	0.0085	0.827
B:Nanotubos	0.3108	0.2438	0.1633	0.4885	0.2492	0.1693	0.1076	0.5044	0.113
C:Promotor	*	0.5667	0.0518	0.5974	0.3793	*	*	0.3967	0.256
<b>INTERACCIONES</b>									
AB: HMA N	0.0899	0.2055	0.8501	0.7962	*	0.1563	0.0569	0.0496	0.4697
AC: HMA PC	0.7975	0.4549	0.1809	0.1093	0.1818	0.7762	0.205	0.7995	0.1949
BC: N PC	0.3284	0.8808	0.5793	0.7238	0.1583	*	0.1869	0.7508	0.8513
ABC: HMA PC N	0.342	0.4207	0.7258	*	0.2964	0.7014	0.0141	0.2736	0.5773
	PESO SECO ESPIGA			NÚM. SEMILLAS			ALTURAS		
	0mg/P	50mg/P	100mg/P	0mg/P	50mg/P	100mg/P	0mg/P	50mg/P	100mg/P
A:HMA	0.781	0.6462	0.9547	0.4629	*	0.2668	0.6347	0.8484	0.2649
B:Nanotubos	0.5275	0.8181	0.9832	0.7516	0.7215	0.8375	0.614	0.0948	0.6181
C:Promotor	0.9542	0.2546	0.1162	0.388	0.7621	0.8862	0.8097	0.43	**
<b>INTERACCIONES</b>									
AB: HMA N	0.0915	0.046	0.8197	0.2834	0.4543	0.4315	0.4502	0.8591	0.9843
AC: HMA PC	0.1516	0.6377	0.9442	0.5501	0.6664	0.0881	0.7159	0.5263	0.8029
BC: N PC	0.1693	0.1605	0.2694	0.5098	0.6233	0.6058	0.4786	0.446	0.2705
ABC: HMA PC N	*	0.0877	0.0822	0.5501	*	0.3142	0.5117	0.0091	0.4399

Como manera complementaria se llevó a cabo un análisis de 2 vías tomando como factores (F1: Biofertilizante, F2: fósforo) con el fin de tener una interpretación más general de los resultados. Se observó que el efecto individual del factor fósforo fue significativo en la respuesta del peso seco de raíz, relación raíz/tallo ( $p \leq 0.01$ ) y peso seco de la espiga ( $p \leq 0.05$ ). El efecto individual del factor biofertilizante fue significativo ( $p \leq 0.05$ ) únicamente en la respuesta del peso seco de raíz y en la relación raíz/tallo (Cuadro 6).

En cuanto al efecto de la interacción entre los factores biofertilizante y fósforo se encontró que solamente la respuesta del peso seco aéreo ( $p \leq 0.05$ ) fue significativa (Cuadro 6).

**Tabla 7. Valores de p del análisis de varianza de 2 vías para el desempeño vegetal y colonización de raíces bajo tres escenarios de fertilización fosforada y ocho biofertilizantes.  $*=p \leq 0.05$ ,  $**=p \leq 0.01$ .**

TABLA VALORES P			
	A: BIOFERTILIZANTE	B: FOSFORO	INTERACCION AB
PESO SECO AEREO	0.1084	**	*
PESO SECO RAIZ	*	**	0.3804
PESO SECO ESPIGA	0.3351	*	0.0944
RELACION R/T	*	**	0.1106
# SEMILLAS	0.9598	0.8306	0.1935
ALTURAS	0.0959	**	0.6434
COLONIZACION	0.5411	**	0.8166

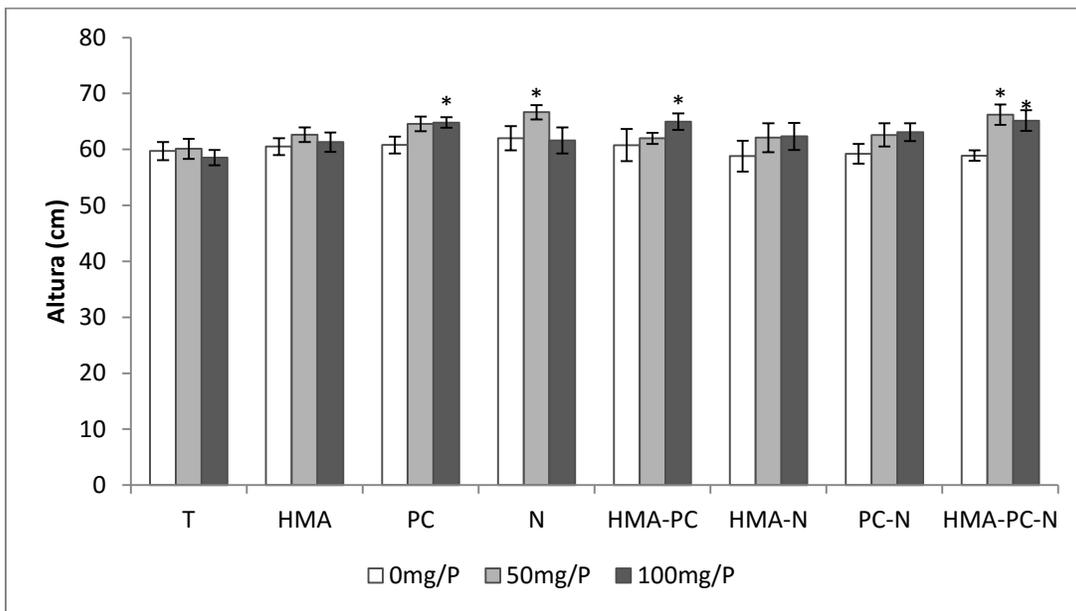
### 6.1.1. Altura de planta

La germinación de las semillas fue homogénea y se dio en los primeros 7 días después de la siembra. En general, a lo largo del tiempo es posible observar una tendencia de los tratamientos sin fósforo que crecieron menos que los tratamientos con fertilización fosforada. Por su parte, los tratamientos de 50 mg/P y 100mg/P tuvieron un patrón de crecimiento similar (Fig. 6).

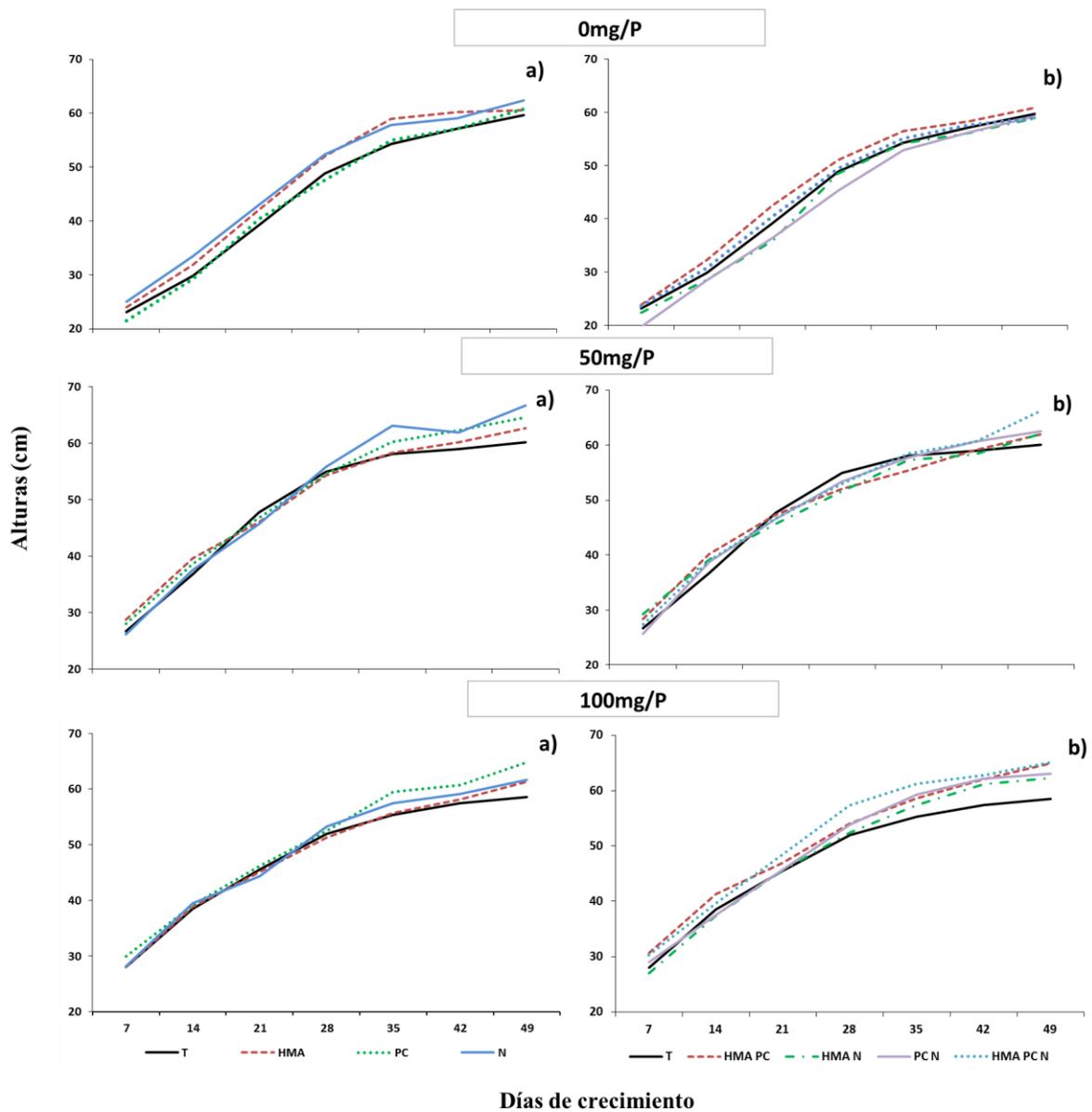
Se encontró que hay una tendencia durante la cuarta y séptima semana de crecimiento en el que las plantas con los biofertilizantes tuvieron una mayor promoción del crecimiento; sin embargo la mayoría de tratamientos fueron homogéneos a la octava semana de crecimiento (Fig. 6).

Se identifican los biofertilizantes como: hongos micorrícicos arbusculares (HMA), promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y nanotubos de carbono (N).

En el análisis de las alturas finales se observó un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) en los tratamientos N y la combinación de HMA-PC-N fertilizados al 50 mg/P con respecto al testigo. El PC solo, la interacción PC-HMA y la combinación HMA-PC-N con fertilización de 100 mg/P también crecieron más que el testigo (Fig. 5).



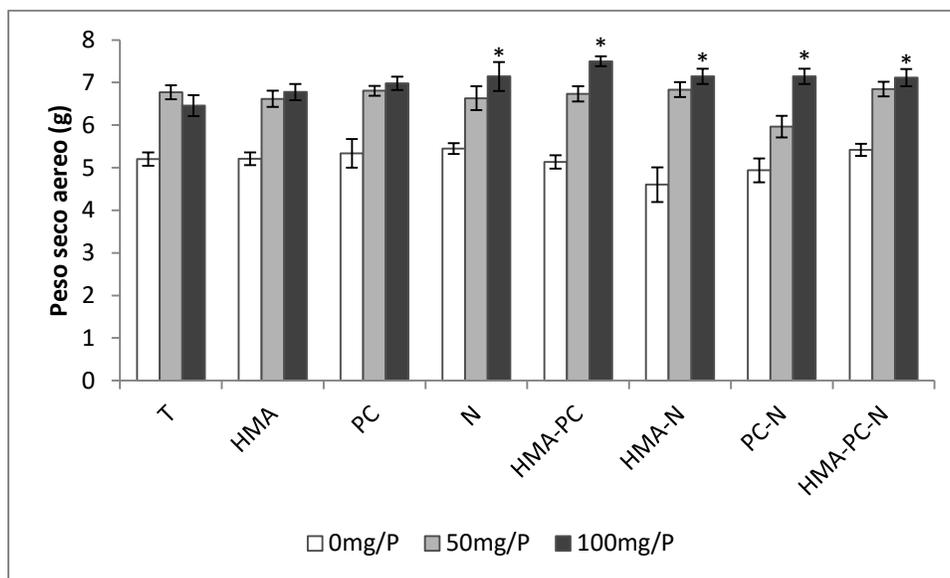
**Fig. 5.** Altura final de plantas de cebada inoculadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de fosforo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de n=6 y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .



**Fig. 6.** Registro de altura luego de ocho semanas de desarrollo de plantas de cebada inoculadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de Fósforo. Del lado izquierdo a) se muestran los tratamientos con biofertilizantes solos. Del lado derecho b) se muestran los tratamientos con biofertilizantes combinados.

### 6.1.2. Peso aéreo seco

En el escenario de 100mg/P se pudo observar un incremento en la biomasa aérea seca en el tratamiento con N y en todos los que tuvieron interacción de biofertilizantes con respecto al testigo (Fig. 7). Se encontró una tendencia de crecimiento en la que a mayor aplicación de fósforo, mayor fue la acumulación de biomasa de las plantas de cebada (Fig. 7).

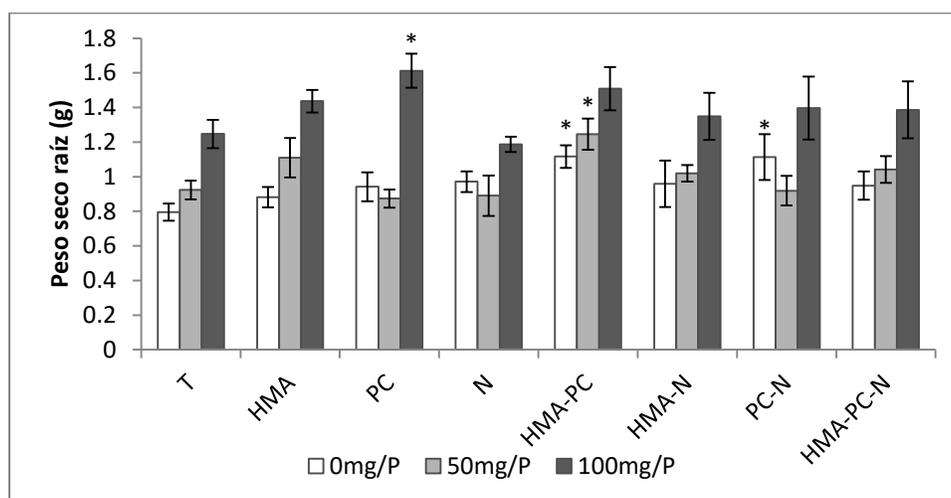


**Fig. 7.** Peso seco de la parte aérea de las plantas de cebada inoculadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo tres escenarios de fertilización con Fósforo de 0mg, 50mg y 100mg. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de n=6 y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .

### 6.1.3. Peso seco de raíz

En el análisis del peso seco de raíz en el escenario sin fósforo (0mg/P) fue posible observar un aumento estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) en los tratamientos de HMA-PC y PC-N con respecto al testigo. Se presentaron efectos significativos en los tratamientos HMA-PC (50mg/P) y en PC (100mg/P). El tratamiento que promovió la mayor biomasa en las raíces fue PC en el escenario de 100mg/P (Fig. 8).

El PC solo y en combinación tuvo los mayores crecimientos, aunque no fue el mismo patrón en todos los escenarios de fertilización. Se encontró una tendencia a desarrollar más biomasa radicular cuando la fertilización fue de 100 mg/P, el resto de tratamientos fueron muy similares.

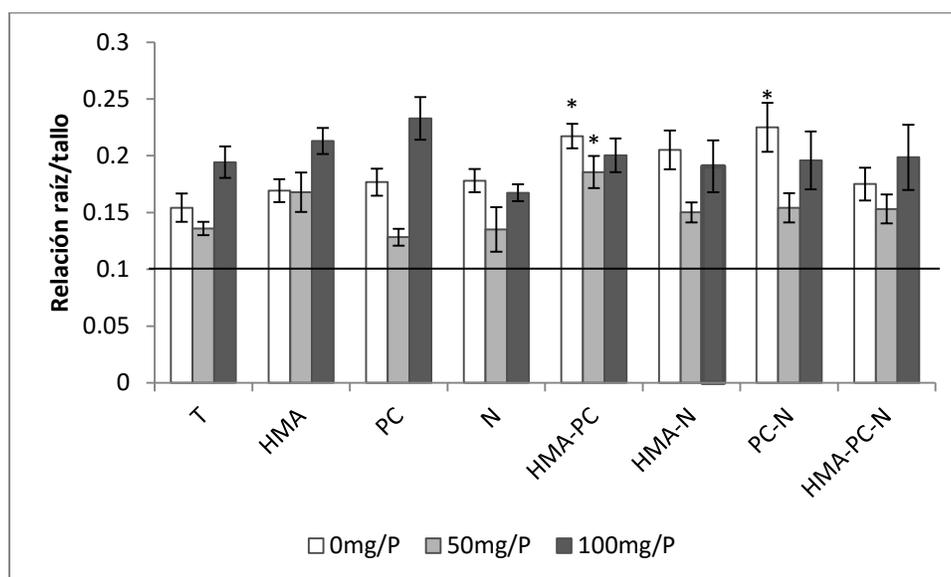


**Fig. 8.** Peso seco de raíces de plantas de cebada inoculadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo tres escenarios de fertilización con Fósforo (0mg, 50mg y 100mg). Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de  $n=6$  y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .

#### 6.1.4. Relación raíz/tallo

La relación raíz/tallo mostró efectos estadísticamente significativos ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al testigo en los tratamientos de HMA-PC y en PC-N en el escenario sin fósforo (0mg/P). En el escenario de 50mg/P también se observó un efecto en el tratamiento de HMA-PC comparado con su testigo. Comparando tratamientos se encontró que el que tuvo un mayor efecto sobre los demás fue PC-N en el escenario sin fósforo (0mg/P) (Fig. 9).

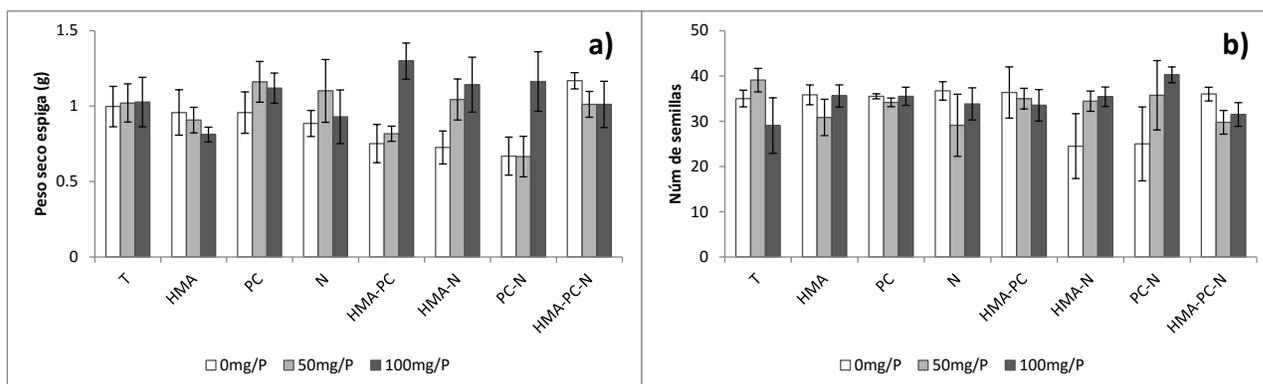
Todos los tratamientos tendieron a desarrollar más biomasa en las raíces que en la parte aérea. En general, en los tratamientos con 50 mg/P hubo mayor equilibrio entre la parte aérea y las raíces (Fig. 9)



**Fig. 9.** Relación raíz-tallo de plantas de cebada tratadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de Fósforo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de n=6 y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .

### 6.1.5. Peso seco de espiga y número de semillas

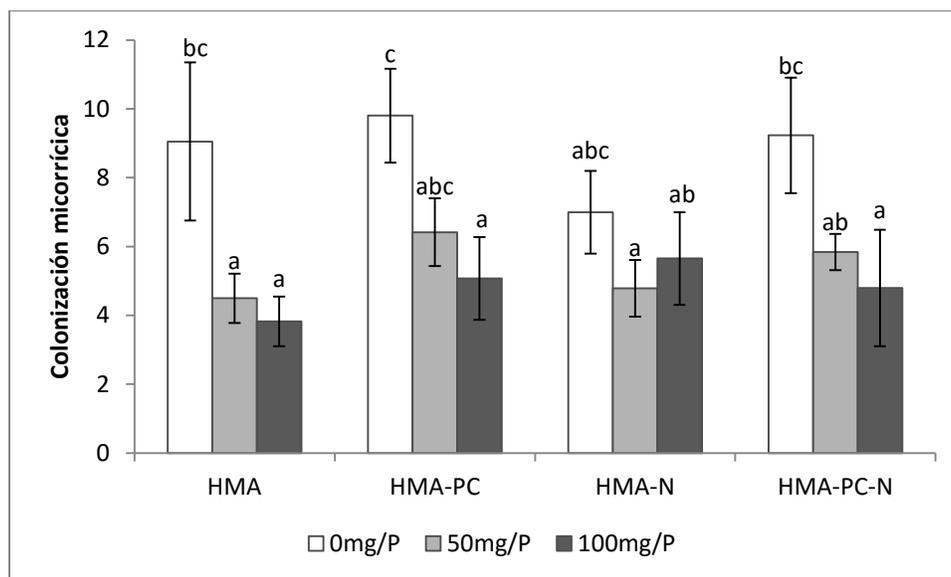
No se encontró un patrón claro en cuanto al peso seco de la espiga. Sólo los tratamientos de HMA-PC y PC-N con fertilización fosforada al 100mg/P promovieron mayor biomasa que el resto de tratamientos, sin embargo, no fueron estadísticamente significativos (Fig. 10a). Por otra parte, tampoco se encontró un patrón definido para el número de semillas. Todos los tratamientos de biofertilización y fósforo mostraron una tendencia similar (Fig. 10 b).



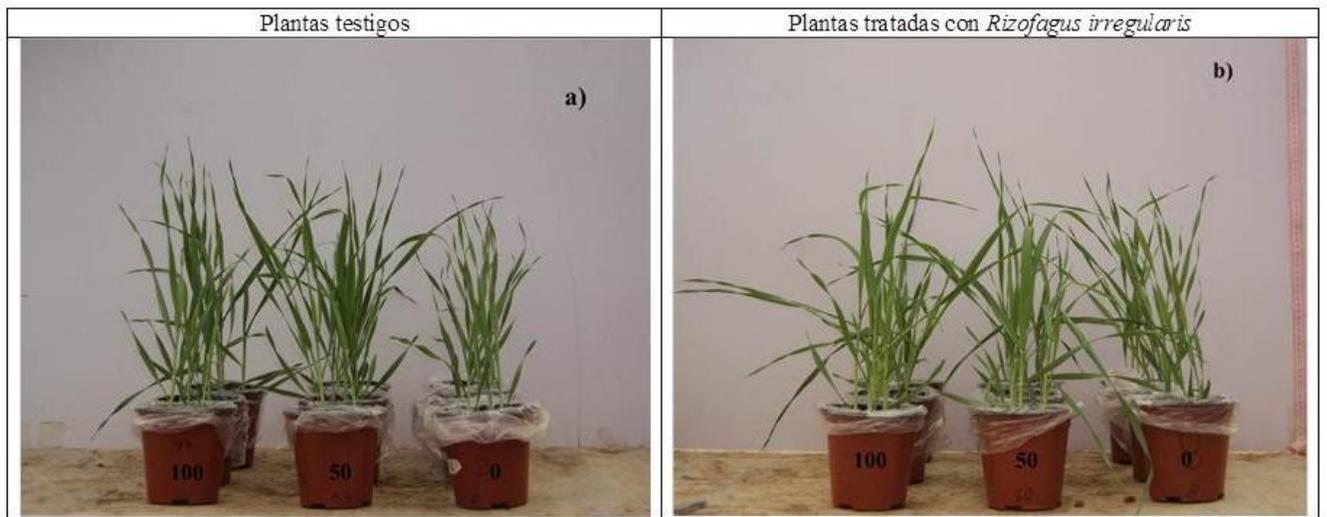
**Fig. 10. a) Peso seco de la espiga y b) número de semillas de plantas de cebada tratado con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de Fósforo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de n=6 y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .**

### 6.1.6. Colonización

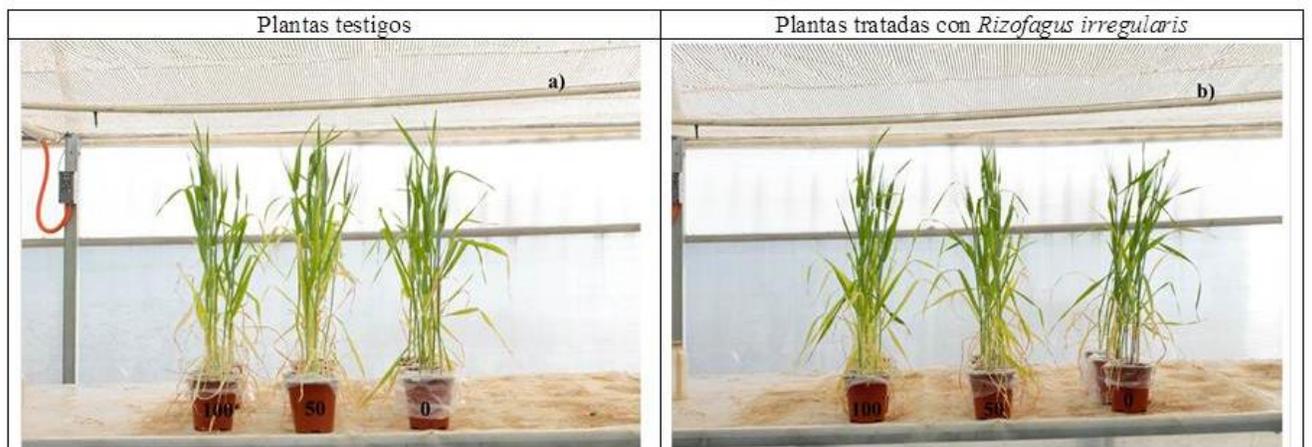
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, es posible observar una tendencia donde a mayor cantidad de fósforo hay una reducción en el porcentaje de la colonización (Fig. 10). Al comienzo de la sección de resultados en el análisis de dos vías se muestra un efecto significativo únicamente en el factor fósforo (Cuadro 5).



**Fig. 11.** Porcentaje de colonización en plantas de cebada tratadas con hongos micorrícicos (HMA), Promotor del crecimiento de *Pseudomonas* spp. (PC) y Nanotubos de carbono (N) bajo escenarios de 0mg, 50mg y 100mg de Fósforo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de n=6 y un test de LSD con  $p \leq 0.05\%$ .



**Fig. 12.** Comparación de plantas testigo con plantas micorrizadas a las 3 semanas de crecimiento. a) Plantas testigo; b) Plantas tratadas con *Rizofagus irregularis*. Se ilustran los niveles de fertilización fosforada (0mg/P, 50mg/P, 100mg/P).



**Fig. 13.** Comparación de plantas testigo con plantas micorrizadas a las 8 semanas de crecimiento. a) Plantas testigo; b) Plantas tratadas con *Rizofagus irregularis*. Se ilustran los niveles de fertilización fosforada (0mg/P, 50mg/P, 100mg/P).

## 7. DISCUSIÓN

En esta proyecto se evaluó el efecto de tres biofertilizantes: HMA (*Rhizophagus irregularis*), promotores de crecimiento obtenidos de *Pseudomonas* spp. y nanotubos de carbono sobre el desarrollo de la cebada en tres escenarios de fertilización fosforada. Así mismo se determinó el efecto de nanotubos de carbono y exudados de *Pseudomonas* spp. en diferentes escenarios de fertilización fosforada sobre la colonización de HMA. En general se observó un incremento en el desarrollo de la cebada cuando se combinaron los biofertilizantes y agregó un alto nivel de fertilización fosforada. Se encontró que cuando no se aplicó fósforo la colonización micorrícica incrementó. En esta sección se discute por separado el efecto de los biofertilizantes en el desarrollo de la cebada; y el efecto del fósforo, nanotubos y exudados de *Pseudomonas* spp. en la colonización micorrícica.

### 7.1. Efecto de los biofertilizantes en el desempeño vegetal de la cebada

El fósforo fue el factor que promovió o limitó la respuesta de los biofertilizantes en la parte aérea. En concordancia, la International Fertilizer Industry Association (2001) menciona que el fósforo es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas y la producción agrícola.

En el presente proyecto se observó que los HMA por si solos no promovieron el desarrollo de biomasa vegetal. Sin embargo cuando fueron combinados con otros biofertilizantes se observó mayor crecimiento de las plantas cuando se fertilizó con 100 mg/P. Lo anterior contrasta con lo mencionado por múltiples autores que mencionan que los HMA son promotores del crecimiento de las plantas (Smith y Read, 2008). Por ejemplo, Jensen (1982) encontró que algunos aislados de HMA del género *Glomus* promovieron significativamente más la biomasa y fósforo en los tejidos pero no fue un efecto generalizado con todos los aislados. El efecto de los HMA depende de la especie de planta y hongo, su compatibilidad funcional y las condiciones del suelo (Van der Heijden et al., 2004).

Se ha puesto en evidencia que las *Pseudomonas* también tienen un efecto en la promoción del crecimiento para maíz y trigo; básicamente a través de solubilización de fósforo y síntesis de fitohormonas (Loredo, 2004). Específicamente *Pseudomonas fluorescens*, promovió un incremento en el rendimiento de la cebada cervecera cuando se aportó fertilización fosforada (Ferraris, 2010). No obstante, en el presente proyecto se encontró que el promotor de crecimiento obtenido a partir de *Pseudomonas* cuando fue aplicado

individualmente no mostró ningún efecto. Es importante considerar que cuando se combinaron los tres biofertilizantes estudiados en un escenario con 100mg/P si se obtuvo promoción del crecimiento. Lo anterior también concuerda con Loredó (2004) quien mencionó que las mezclas o combinación de *Pseudomonas* y HMA utilizados como inóculo de semillas dan mejor resultado en el rendimiento de las gramíneas, que cuando se inoculan los microorganismos de forma individual.

Estudios recientes han demostrado que la aplicación de nanotubos de carbono en semillas de cultivo de maíz, soya y cebada puede acelerar la germinación así como activar el crecimiento en plántulas (Mohamed, 2013; Khodakovskaya, 2011). Aunado a esto se observó que los nanotubos aumentaron la biomasa final de las plantas de cebada; sin embargo este efecto no se vio reflejado en el rendimiento de la espiga. Esto contrasta con lo reportado por Khodakovskaya et al. (2012), quienes encontraron que los nanotubos de carbono aplicados en plantas de tomate incrementaron la cantidad de flores y frutos sin afectar la diversidad de microorganismos del suelo. Es importante considerar que los nanotubos de carbono tienen múltiples aplicaciones debido a sus propiedades. Pero debido a su reciente desarrollo, no existe la suficiente información de sus efectos en la industria agrícola. Por esta razón no es posible inferir si el efecto significativo en la biomasa de la cebada se debe sólo a la inoculación con nanotubos o a una combinación de factores incluyendo los ambientales.

## **7.2. Efecto del fósforo, nanotubos de carbono y promotores del crecimiento de cebada sobre la colonización micorrícica**

Se ha reportado que a mayor concentración de fósforo disponible en el suelo se inhibe el desarrollo de HMA (Brundett, 1996). Lo anterior fue consistente en el presente experimento donde se observó que la colonización micorrícica fue afectada únicamente por la fertilización fosforada. De igual manera la inoculación de biofertilizantes no mostró ningún efecto significativo en la micorrización.

A pesar de la reducción en la colonización micorrícica es posible que el aporte de los HMA a la nutrición de la planta pueda mantenerse, puesto que no hay una relación directa entre porcentaje de colonización y el aporte de los HMA en la absorción de fósforo (Smith y Read, 2008).

Se ha reportado que existen interacciones sinérgicas entre bacterias promotoras del crecimiento vegetal y los HMA. Específicamente, las bacterias del género *Pseudomonas*

tienen efectos benéficos sobre la: germinación de esporas, colonización de micorriza, solubilización de fósforo e inhibición de hongos patógenos (Artursson, 2006). Sin embargo, lo anterior no fue observado en la interacción HMA-promotor del crecimiento con respecto a la colonización micorrícica.

## 8. CONCLUSIONES

No hubo ningún biofertilizante que mostrara un mayor efecto sobre los demás. Cuando fueron combinados los biofertilizantes presentaron un incremento en la biomasa de la planta; sin embargo, este efecto no se observó en la espiga.

El fósforo fue el factor que promovió o limitó la respuesta de los biofertilizantes en la parte aérea. El efecto de la interacción de los biofertilizantes depende del fósforo disponible en el suelo.

Los nanotubos de carbono y exudados de *Pseudomonas* spp. no afectaron el desarrollo de HMA. El fósforo, en cambio, aparentemente redujo la colonización de los HMA. Es por esto que se puede suponer que a mayor cantidad de fósforo disminuye la colonización micorrícica.

La hipótesis planteada en un principio concuerda con los resultados obtenidos, por lo que la inoculación con biofertilizantes tiene un efecto benéfico en el desempeño vegetal de la cebada. A mayor disponibilidad de fósforo y combinando los distintos biofertilizantes mejora el desempeño vegetal de la cebada.

## **9. EXPECTATIVAS Y LIMITACIONES**

Es necesario evaluar el efecto de los biofertilizantes y fertilización fosforada hasta la obtención de la espiga seca, ya que en las ocho semanas de crecimiento no todas las plantas llegaron a espigar totalmente. Así mismo analizar la calidad de la espiga dependiendo del uso final que se le propone dar.

Llevar a cabo análisis foliares de nitrógeno y fósforo podrían generar más información del efecto de los biofertilizantes en la nutrición de la cebada bajo los diferentes escenarios de fertilización fosforada.

Es necesario generar más conocimiento sobre el efecto de los nanotubos de carbón como promotores de crecimiento en especies vegetales. En el presente experimento se observó un efecto benéfico en el desarrollo de biomasa seca; sin embargo, al no existir mucha información del uso de nanotubos en la agricultura no es posible inferir con certeza su efecto en la cebada.

El uso de biofertilizantes combinados resulta una opción viable para eficientizar el uso de recursos agroquímicos en el cultivo de cebada. El desarrollo de estos fertilizantes biológicos nos ofrece un acercamiento a la agricultura sustentable donde se da un manejo adecuado de la diversidad biológica del suelo con el fin de favorecer las interacciones benéficas mejorando así la producción agrícola. Por esta razón la importancia del estudio y entendimiento de las interacciones biológicas del suelo y el desarrollo de este tipo de biofertilizantes es fundamental.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, M. J. F. (2000). Los Biofertilizantes. Revista, Hortalizas, frutas y flores. N de Febrero. Ed. Año Dos Mil. México. D.F. pp. 30-31.
- Alanís, E. Guerrero, I. (2004). *Pseudomonas* en biotecnología [versión electrónica]. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Revista Biotecnología. 9(1). 26-37.
- Álvarez, J. D. Ferrera, R. (1994). Los microorganismos del suelo en la estructura función de los agroecosistemas. Instituto de Recursos Naturales. Programa de Edafología. Colegio de Postgraduados, Montecillo. México.
- American Society for Testing and Materials. (2006). Standard terminology relating to nanotechnology. West Conshohocken, PA. p. E2456-06.
- Bojórquez, A. D. A., Gutiérrez, C. G., Báez, J. R. C., Sánchez, M. Á. A., Montoya, L. G., & Pérez, E. N. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56.
- Artursson, V., Finlay, R. D., & Jansson, J. K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental microbiology*, 8(1), 1-10.
- Barea, J. M., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* (pp. 195-212). Springer Berlin Heidelberg.
- Barker, S. J., Tagu, D., & Delp, G. (1998). Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant physiology*, 116(4), 1201-1207.
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8), 1225-1228.
- Bedini, S., Pellegrino, E., Avio, L., Pellegrini, S., Bazzoffi, P., Argese, E., & Giovannetti, M. (2009). Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(7), 1491-1496.

- Bieto, J. A., Cubillo, M. T., Mangas, I. B., & Ormaechea, A. G. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Bonfante, P. (2001). At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In *Fungal Associations* (pp. 45-61). Springer Berlin Heidelberg.
- Box A. (2008). The biology of *Hordeum vulgare* L. (barley). University of Adelaide. Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator. Australia.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuk, N. (1996). Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture: Australian Centre for International Agricultural Research. *Canberra, Australia, 344*.
- Bücking, H., Liepold, E., & Ambilwade, P. (2012). *The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes*. INTECH Open Access Publisher.
- Carranco J.C. 2010. Uso de micorriza (*Glomus intraradices*) en cultivos de sorgo y maíz. Programa elaboración de casos de éxito de innovación en el sector agroalimentario. Fundación Produce Tamaulipas
- Darrah, P. R. (1993). The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, 155(1), 1-20.
- Díaz G. M. (2008). Síntesis de nanotubos de carbón por pirólisis de hidrocarburos botánicos. Facultad de Ingeniería Química. UMSNH. Morelia, Michoacán.
- Dotor M.Y. (2014). Mecanismos de Resistencia Sistémica en Plantas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Maestría en Fisiología Vegetal. UPTC.
- Ferraris, G. (2009). Microorganismos con efecto promotor de crecimiento (PGPM) en cultivos extensivos. Impacto sobre los rendimientos, la eficiencia de uso de los nutrientes y otros caracteres de interés agronómico. Resúmenes. pp8-9. *II Jornadas Bonaerenses de Microbiología de Suelos. "Herramientas Microbiológicas para una Agricultura Sustentable" UNICEN, Azul (BA), 9*.

- Ferraris, G. N., & Couretot, L. A. (2001). *Pseudomonas fluorescens* en cebada cervecera bajo diferentes niveles de fertilización fósforo-nitrogenada. *Agromercado. Cuadernillo Temático, Colza y Cebada. abril 2001.*
- Ferraris, G., & Faggioli, V. (2011). Inoculación con microorganismos con efecto promotor de crecimiento. Conocimientos actuales y experiencias realizadas en la Región Pampeana Argentina. 18 pp. In *Anales del Internacional de Rizósfera, Biodiversidad y Agricultura sustentable. XXII Congreso Argentino de Microbiología.*
- De Salamone, I. E. G. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal. *Informaciones Agronómicas*, 12.
- Garza, M. B. I., Vázquez, P. V., García, D. G., Tut, C., Martínez, I. R., Campos, A. T., ... & Medina, J. F. A. (2003). Respuesta de cultivos agrícolas a los biofertilizantes en la región central de México.
- Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytologist*, 84(3), 489-500.
- Harley, J.L., & Smith, S.E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London. pp. 438
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.
- Hinsinger, P. (1998). HOW DO PLANT ROOTS ACQUIRE MINERAL NUTRIENTS? CHEMICAL PROCESSES INVOLVED IN THE RHIZOSPHERE. *Advances in agronomy*, 64, 225-265.
- Hodge, A., Helgason, T., & Fitter, A. H. (2010). Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*, 3(4), 267-273.
- INIFAP. (2009). Biofertilizantes, Alternativa para una producción agrícola sustentable: INIFAP. Taller PROMAF 2009.
- International Fertilizer Industry Association. (2001). Total fertilizer consumption statistics by region from 1970/71 to 1998/99. (<http://www.fertilizer.org/stats.htm>).

- IBMC, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg. (2014). Estructura denanotubos de carbono (<http://www-ibmc.u-strasbg.fr/ict/vectorisation/nanotubes.shtml>).
- Jensen, A. (1982). Influence of four vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on nutrient uptake and growth in barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist*, *90*(1), 45-50.
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., & Biris, A. S. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS nano*, *3*(10), 3221-3227.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., & Schroth, M. N. (1988). Pseudomonas inoculants to benefit plant production. *ISI ATLAS SCI: ANIM. PLANT SCI.*, *1*(1), 60-64.
- Leisinger, T., & Margraff, R. (1979). Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiological Reviews*, *43*(3), 422.
- Linderman, R. G. (2000). Effects of mycorrhizas on plant tolerance to diseases. In *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function* (pp. 345-365). Springer Netherlands.
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., & Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, *22*(2), 225-239.
- López I. (2005). Qué se sabe sobre la calidad del suelo y su importancia. Instituto de Investigaciones Biológicas de la UV. Nueva época No. 94-96. Veracruz, México.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the total environment*, *408*(16), 3053-3061.
- Khodakovskaya, M. V., Kim, B. S., Kim, J. N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., & Cernigla, C. E. (2013). Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small*, *9*(1), 115-123.
- Lahiani, M. H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A. S., & Khodakovskaya, M. V. (2013). Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS applied materials & interfaces*, *5*(16), 7965-7973.

- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Baldani, V. L., Scavino, A. F., de Salamone, I. G., Baca, B. E., ... & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Revista CORPOICA. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*, 55(1), 158-188.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1-2), 305-339.
- SAGARPA. (2012). PLAN RECTOR. Comité del sistema producto cebada del estado de Michoacán. A.C.
- Smith S. E., Read D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press in Elsevier. Great Britain. 785 p.
- Soria, E. G., de la Garza Carranza, M. T., Salazar, J. A. G., Martínez, J. H., Rebollar, S. R., & Razo, F. D. J. G. (2013). La oferta de cebada grano en México: un análisis econométrico/Barley grain supply in Mexico: an econometric analysis/A oferta de grão de cevada no México: uma análise econométrica. *Revista de Globalización, Competitividad y Gobernabilidad*, 7(2), 44.
- Cadavid A. (2008). Un nuevo enfoque al uso de extractos botánicos en agricultura [versión electrónica]. Septiembre. *Revista RED Agrícola* 5(23). Consultado 20 abril, 2015. (<http://www.chileagro.cl/articulos/20100802112030.pdf>)
- Van Der Heijden, M. G., Wiemken, A., & Sanders, I. R. (2003). Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. *New Phytologist*, 157(3), 569-578.
- Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., & Lavakush, S. V. (2010). Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research*, 5, 954-983.

# 11.ANEXOS

## Anexo 2. Análisis edafológico del suelo utilizado



### Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal (Campo Experimental Bajío)

#### ANÁLISIS COMPLETO DE SUELO

INFORMACION GENERAL			
No. Registro :	1539	Ciudad :	Mérida
Fecha Recepción :	05/14/2013	Cliente :	UNAM
Fecha Entrega :	05/21/2013	Municipio :	Mérida
Prof. de Muestra :	0-25 cm.	Estado :	Yucatán
Propietario :	Universidad Nacional Autónoma de México	Tipo de Análisis :	Suelo
Propiedad :	C.E. CRUCCO - U.A. de México	Agricultura :	Riego
Propiedad :	C.E. CRUCCO - U.A. de México	Cultivo :	Mazorca

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL SUELO	
Arena :	19.48%
Arcilla :	53.24%
Limo :	27.28%
Tipo de Suelo :	Arcilla
Punto de Saturación :	50.0 % Mod. Alto
Capacidad de Campo :	37.5 %
Punto March. Perm. :	19.7 %
Cond. Hidráulica :	ND cm/hr ND
Densidad Aparente :	1.17 g/cm <sup>3</sup> Color Munsell :

REACCIÓN DEL SUELO	
pH (1:2 agua) :	7.28 Neutro
pH (1:2 CaCl <sub>2</sub> ) :	ND ND
Carbonatos Totales (%) :	1.46 Bajo
Requisitos de Cal :	No Req. Ton/Ha
Requisitos de Yeso :	No Req. Ton/Ha

FERTILIDAD												
Muy Alto												
Alto												
Mod. Alto												
Mediano												
Mod. Bajo												
Bajo												
Muy Bajo												
Determinación	MO	N-Inorg	P-Bray	K	Ca	Mg	Na *	Fe	Zn	Mn	Cu	
Unidades	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	
Resultados	2.74	23.2	5.80	303	2985	709	192	76.2	5.37	50.5	1.97	

\* Es deseable que este elemento sea bajo

EXTRACTO DE SATURACION (SALINIDAD-SODICIDAD)			
Cte :	0.43 dS/m	RAS :	4.47
pH <sub>s</sub> :	7.10	PSI :	3.72
<b>Cationes (meq/l)</b>	<b>Aniones (meq/l)</b>	Muy Alto	
Ca ++ :	0.40	CO <sub>3</sub> :	0.40
Mg ++ :	0.30	HCO <sub>3</sub> :	0.60
Na + :	0.95	Cl - :	1.11
K + :	0.71	SO <sub>4</sub> :	2.43
PO <sub>4</sub> :	0	N-NO <sub>3</sub> :	0
		Grado de	Salas RAS PSI

RELACIONES DE BASES DE CAMBIO			
Muy Alto			
Alto			
Mediano			
Bajo			
Muy Bajo			
Relación	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K
Resultados	2.56	7.55	26.9
Rango Medio	2 - 6	2 - 3	20 - 30

PORCENTAJE ACTUAL Y SUGERIDO DE LAS BASES DE CAMBIO								
		H	Al	Acidez Total Interc.	Ca ++	Mg ++	K +	Na +
Resultado	meq/100 gr	ND	ND	ND	14.9	5.81	0.77	0.83
	% Actual	ND	ND	ND	66.8	26.1	3.45	3.72
Sugerido	% Sugerido	0 - 5	0 - 5	0 - 10	65 - 75	10 - 20	ND	0 - 5

COMENTARIOS	ATENTAMENTE
	<b>IBQ MAYRA LIZBETH FRIAS P.</b>
	ENCARGADO(A) DE LABORATORIO

Km. 6.5 Carr. Celaya, San Miguel de Allende, Celaya. Gto. C.P. 38110; Tel (461) 81 1 53 23 Ext. 226 y 227 labsuelos.inifap@hotmail.com FOR-SU-02, Revisión 3

**Anexo 2. Desempeño vegetal. Análisis de varianza 3 factores (F1: HMA, F2: nanotubos y F3: promotor de crecimiento). En cada tratamiento se muestra la media seguida de la desviación estándar resultante del análisis estadístico.**

Estructura vegetal		Tratamientos								
		Testigo	HMA	PC	N	HMA	HMA N	PC N	HMA PC	
Peso seco aéreo			5.21±0.	5.34±0.	5.45±0.	5.14±0.	4.60±0.	4.94±0.	5.42±0.	
	0 mg/P	5.2±0.2	2	3	1	2	4	3	1	
	50 mg/P	6.77±0.	6.62±0.	6.81±0.	6.63±0.	6.74±0.	6.83±0.	5.97±0.	6.85±0.	
	100 mg/P	6.46±0.	6.77±0.	6.98±0.	7.14±0.	7.50±0.	7.14±0.	7.14±0.	7.11±0.	
		2	2	2	3	1	2	2	2	
Peso seco raíz			0.88±0.	0.94±0.	0.97±0.	1.12±0.	0.96±0.	1.11±0.	0.95±0.	
	0 mg/P	0.8±0.1	1	1	1	1	1	1	1	
	50 mg/P	0.92±0.	1.11±0.	0.87±0.	0.89±0.	1.25±0.	1.02±0.	0.92±0.	1.04±0.	
	100 mg/P	1.25±0.	1.44±0.	1.61±0.	1.19±0.	1.51±0.	1.35±0.		1.39±0.	
		1	1	1	3	1	1	1.4±0.2	2	
Peso seco espiga			0.96±0.	0.96±0.	0.89±0.	0.75±0.	0.73±0.	0.67±0.	1.17±0.	
	0 mg/P	1±0.2	2	3	1	2	4	3	1	
	50 mg/P	1.02±0.	0.91±0.	1.16±0.		0.82±0.	1.04±0.	0.67±0.	1.01±0.	
	100 mg/P	1.03±0.	0.81±0.	1.12±0.	0.93±0.		1.14±0.	1.16±0.	1.01±0.	
		2	2	2	3	1.3±0.1	2	2	2	
No. de semillas			35.83±	35.5±0.	36.7±2.	36.33±	29.4±6.	37.5±3.		
	0 mg/P	35±1.8	2.2	6	0	5.7	4	2	36±1.5	
	50 mg/P	39.08±	30.83±	34.17±	34.94±	34.97±	34.42±	42.90±	29.75±2	
	100 mg/P	34.84±	35.58±	35.5±2.	33.83±	33.52±	35.42±	40.25±	31.48±2	
		2.6	4.0	1.0	4.4	2.3	2.2	3.3	.6	
Raíz / Tallo			0.15±0.	0.17±0.	0.18±0.	0.18±0.	0.22±0.	0.21±0.	0.23±0.	0.18±0.
	0 mg/P	01	01	01	01	01	02	02	01	
	50 mg/P	0.14±0.	0.17±0.	0.13±0.	0.14±0.	0.19±0.	0.15±0.	0.15±0.	0.15±0.	
	100 mg/P	0.19±0.	0.21±0.	0.23±0.	0.17±0.	0.20±0.	0.19±0.	0.20±0.	0.20±0.	
		01	01	02	01	01	02	03	03	
Colonización micorrícica			9.05±2.			9.80±1.			9.23±1.	
	0 mg/P	-	3	-	-	4	7±1.2	-	7	
	50 mg/P		4.49±0.			6.42±1.	4.78±0.		5.84±0.	
	100 mg/P		3.82±0.			5.07±1.	5.65±1.		4.79±1.	
		-	7	-	-	2	3	-	7	

**Anexo 3. Desempeño vegetal. Análisis de varianza 3 factores (F1: HMA, F2: nanotubos y F3: promotor de crecimiento). En cada tratamiento se muestra el grupo homólogo resultante del análisis estadístico.**

Estructura vegetal		Tratamientos								
		Testigo	HMA	PC	N	HMA PC	HMA N	PC N	HMA PC N	
Peso seco aéreo	0 mg/P	ab	ab	b	b	ab	ab	ab	b	
	50 mg/P	b	b	b	b	b	b	a	b	
	100 mg/P	a	ab	abc	bc	c	bc	bc	bc	
Peso seco raíz	0 mg/P	a	ab	ab	ab	b	ab	b	ab	
	50 mg/P	a	ab	a	a	b	ab	a	ab	
	100 mg/P	a	ab	b	a	ab	ab	ab	ab	
Peso seco espiga	0 mg/P	ab	ab	ab	ab	a	a	a	b	
	50 mg/P	ab	ab	b	b	ab	b	a	ab	
	100 mg/P	ab	a	ab	ab	B	ab	ab	ab	
No. de semillas	0 mg/P	a	a	a	a	a	a	a	a	
	50 mg/P	bc	a	ab	abc	abc	abc	c	a	
	100 mg/P	ab	ab	ab	ab	ab	ab	b	a	
Raíz / Tallo	0 mg/P	a	ab	ab	abc	cd	bcd	d	ab	
	50 mg/P	ab	bc	a	ab	c	abc	abc	abc	
	100 mg/P	ab	ab	b	A	ab	ab	ab	ab	
Colonización micorrícica	0 mg/P	-	a	-	-	a	a	-	a	
	50 mg/P	-	a	-	-	a	a	-	a	
	100 mg/P	-	a	-	-	a	a	-	a	

**Anexo 4. Pruebas de Múltiple Rangos para ALTURAS FINALES por Tratamiento\_ General.**

Método: 95.0 porcentaje LSD

Trat_ General	Casos	Media	Grupos Homogéneos	
16	6	58.55	X	a
5	6	58.8	X	a
7	6	58.9	X	a
6	6	59.2	X	a
0	6	59.7	XX	ab
8	6	60.1	XXX	abc
1	6	60.5167	XXX	abc
4	6	60.7667	XXX	abc
2	6	60.7833	XXX	abc
17	6	61.3	XXXX	abcd
19	6	61.6	XXXXX	abcde
12	6	61.9833	XXXXX	abcde
3	6	62	XXXXX	abcde
13	6	62.1	XXXXX	abcde
21	6	62.3333	XXXXX	abcde
14	6	62.5833	XXXXX	abcde
9	6	62.6333	XXXXX	abcde
22	6	63.0833	XXXXX	abcde
10	6	64.55	XXXX	bcde
18	6	64.8167	XXXX	bcde
20	6	64.9667	XXX	cde
23	6	65.15	XXX	cde
15	6	66.2333	XX	de
11	6	66.65	X	e

**Anexo 5. Pruebas de Múltiple Rangos para PESO SECO AÉREO por Tratamiento\_ General.**

**Método: 95.0 porcentaje LSD**

Trat_ General	Media	Grupos Homogéneos	
5	4.60217	X	A
6	4.93683	XX	Ab
4	5.13533	XX	Ab
0	5.2	XX	Ab
1	5.21133	X	B
2	5.33617	X	B
7	5.41767	XX	Bc
3	5.44967	XX	Bc
14	5.96717	XX	Cd
16	6.45833	XX	De
9	6.61717	XX	Ef
11	6.6315	XX	Ef
12	6.73617	XX	Ef
8	6.773	XX	Ef
17	6.77483	XX	Ef
10	6.80767	XX	Ef
13	6.83383	XX	Ef
15	6.8465	XX	Ef
18	6.98017	XXX	Efg
23	7.11417	XX	Fg
22	7.1435	XX	Fg
19	7.144	XX	Fg
21	7.1445	XX	Fg
20	7.49733	X	G

**Anexo 6. Pruebas de Múltiple Rangos para PESO SECO RAIZ por Tratamiento\_ General.**

Método: 95.0 porcentaje LSD

Trat_ General	Media	Grupos Homogéneos	
0	0.795333	X	A
10	0.873667	XX	Ab
1	0.881667	XX	Ab
11	0.890333	XX	Ab
14	0.919167	XXX	abc
8	0.9235	XXX	abc
2	0.9415	XXX	abc
7	0.948833	XXX	abc
5	0.959667	XXX	abc
3	0.971	XXXX	abcd
13	1.02017	XXXX	abcd
15	1.042	XXXX	abcd
9	1.1095	XXXX	bcde
6	1.11367	XXXX	bcde
4	1.11633	XXXX	bcde
19	1.18717	XXXX	cdef
12	1.24583	XXXX	defg
16	1.24683	XXXX	defg
21	1.349	XXXX	efgh
23	1.38633	XXXX	efgh
22	1.39683	XXX	Fgh
17	1.4365	XXX	Fgh
20	1.509	XX	Gh
18	1.61233	X	H

**Anexo 7. Pruebas de Múltiple Rangos para RELACION RAIZ TALLO por Tratamiento\_ General.**

Método: 95.0 porcentaje LSD

Trat_	Media	Grupos Homogéneos	
10	0.128266	X	A
11	0.135244	XX	Ab
8	0.135981	XX	Ab
13	0.150136	XXX	Abc
15	0.153136	XXXX	Abcd
14	0.154151	XXXX	Abcd
0	0.154252	XXXX	Abcd
19	0.167426	XXXXX	Abcde
9	0.167897	XXXXX	Abcde
1	0.169284	XXXXXX	Abcdef
7	0.175124	XXXXXX	Bcdefg
2	0.176741	XXXXXX	Bcdefg
3	0.178042	XXXXXX	Bcdefg
12	0.185609	XXXXXX	Cdefgh
21	0.190627	XXXXXXX	Cdefghi
16	0.194313	XXXXXX	Cdefgh
22	0.195945	XXXXXX	Cdefgh
23	0.198577	XXXXX	Defgh
20	0.200483	XXXXX	Defgh
5	0.205197	XXXXX	Defgh
17	0.212947	XXXX	Efgh
4	0.217331	XXX	Fgh
6	0.225003	XX	Gh
18	0.232982	X	H

**Anexo 8. Pruebas de Múltiple Rangos para PESO SECO ESPIGA por Tratamiento\_ General.**

Método: 95.0 porcentaje LSD

Trat_ General	Media	Grupos Homogéneos	
14	0.665333	X	a
6	0.669167	X	a
5	0.7255	XX	ab
4	0.751833	XXX	abc
17	0.811167	XXXX	abcd
12	0.816833	XXXX	abcd
3	0.885333	XXXX	abcd
9	0.9075	XXXX	abcd
19	0.9295	XXXXX	abcde
2	0.956833	XXXXX	abcde
1	0.9575	XXXXX	abcde
0	0.997167	XXXXX	abcde
15	1.01133	XXXXX	abcde
23	1.01167	XXXXX	abcde
8	1.02033	XXXXX	abcde
16	1.02667	XXXXX	abcde
13	1.044	XXXX	cbde
11	1.10083	XXX	bde
18	1.1195	XXX	bde
21	1.14217	XX	de
10	1.16067	XX	de
22	1.16333	XX	de
7	1.16817	XX	de
20	1.29833	X	e

**Anexo 9. Pruebas de Múltiple Rangos para # SEMILLAS por Tratamiento\_ General.**

Método: 95.0 porcentaje LSD

Trat_ General	Media	Grupos Homogéneos	
5	24.5	X	a
6	25	XX	ab
16	29.0333	XXX	abc
11	29.1167	XXX	abc
15	29.75	XXX	abc
9	30.8333	XXX	abc
23	31.4833	XXX	abc
20	33.5167	XXX	abc
19	33.8333	XXX	abc
10	34.1667	XXX	abc
13	34.4167	XXX	abc
12	34.9667	XXX	abc
0	35	XXX	abc
21	35.4167	XXX	abc
2	35.5	XXX	abc
18	35.5	XXX	abc
17	35.5833	XXX	abc
14	35.75	XXX	abc
1	35.8333	XXX	abc
7	36	XX	bc
4	36.3333	XX	bc
3	36.7	X	c
8	39.0833	X	c
22	40.25	X	c

**Anexo 10. Pruebas de Múltiple Rangos para COLONIZACIÓN por Tratamiento\_ General.**

Método: 95.0 porcentaje LSD

Trat_ General	Media	Grupos Homogéneos	
9	3.82425	X	a
5	4.49467	X	a
7	4.78289	X	a
12	4.79273	X	a
10	5.07284	X	a
11	5.65111	XX	ab
8	5.83644	XX	ab
6	6.4159	XXX	abc
3	6.99689	XXX	abc
1	9.04843	XX	bc
4	9.22908	XX	bc
2	9.80215	X	c