



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA
EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO
DE JALISCO, A. C.



**EVALUACIÓN DE ACCESIONES ORNAMENTALES DE *Helianthus* spp
COLONIZADAS POR HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PARA
REMEDIA SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS**

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA
Especialidad en Mejoramiento Genético

QUE PRESENTA

ISABEL VITAL VILCHIS

Comité Tutorial

Director: Dr. Gabriel Rincón Enríquez

Codirectora: Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar

Asesor: Dr. Cecilia Guízar González

Asesor: Dr. Jhony Navat Enríquez Vara



Zapopan, Jalisco. Enero de 2019.



Zapopan, Jalisco a 9 de Enero de 2019

Dr. Rodrigo Barba González
Coordinador Académico de la Maestría
en Ciencias de la Floricultura
Zapopan, Jalisco

El que suscribe **Dr. Gabriel Rincón Enríquez** director de tesis del estudiante **Isabel Vital Vilchis**, una vez leída y revisada la Tesis titulada **“Evaluación de accesiones ornamentales de *Helianthus spp* colonizadas por hongos micorrízicos arbusculares para remediar suelos contaminados con metales pesados”** aceptó que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmo la presente a los 9 días del mes de enero del año 2019.

Dr. Gabriel Rincón Enríquez
Director de Tesis de Maestría



Zapopan, Jalisco a 25 de Enero de 2019

Dr. Rodrigo Barba González
Coordinador Académico de la Maestría
en Ciencias de la Floricultura
Zapopan, Jalisco

Los que suscriben integrantes del jurado de examen de grado de la estudiante **Isabel Vital Vilchis**, una vez leída y revisada la Tesis titulada **“Evaluación de accesiones ornamentales de *Helianthus* spp colonizadas por hongos micorrízicos arbusculares para remediar suelos contaminados con metales pesados”** aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 25 días del mes de enero del año 2019.

Presidente

Dr. Ramiro Eleazar Ruíz Nájera

Secretario

Dr. Guillermo Alejandro Solís Sánchez

Vocal

Dra. Laura Izascum Pérez Valencia

Vocal

Dr. Gabriel Rincón Enríquez



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este punto proviene en las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenecen patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollados pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño A.C. y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

IBT. Isabel Vital Vilchis



El trabajo de esta tesis de investigación de maestría formó parte del proyecto titulado:

“Empleo de Hongos Micorrícicos Arbusculares en la Agro-Biotecnología del empleo de plantas”

Líderes del proyecto: Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar

Dr. Gabriel Rincón Enríquez

Igualmente, este trabajo contó con apoyo del proyecto 293362 (CONACyT) del laboratorio nacional PLANTECC.

Líderes del proyecto: Dr. Gabriel Rincón Enríquez (CIATEJ) y Dr. Axel Tiessen Favier (CINVESTAV-IPN).

La presente investigación de maestría se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. bajo la co-dirección del Dr. Gabriel Rincón Enríquez y la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, así como la asesoría de la Dra. Elizabeth Hernández Acosta de la Universidad Autónoma Chapingo y la asesoría del Dr. Jhony Navat Enríquez Vara y de la Dra. Cecilia Guízar González del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

De los resultados de esta tesis se han publicado y presentado en foros académicos los siguientes trabajos:

Publicaciones sometidas o publicadas en revistas de divulgación:

Vital-Vilchis, I., E.E Quiñones-Aguilar, G. Rincón-Enríquez (2018) Plantas limpiadoras: la fitorremediación. Aceptado para publicación Revista Eek.

Publicaciones sometidas o publicadas en revistas científicas:

Vital-Vilchis, I., E. E. Quiñones-Aguilar, L. G. Hernández-Montiel, G. Rincón-Enríquez (2018) Viabilidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares y semillas de girasol para el establecimiento de la simbiosis micorrizica. Aceptada en Revista Biotecnología y Sustentabilidad.

Vital-Vilchis, I., E. E. Quiñones-Aguilar, L. G. Hernández-Montiel, B. Murillo-Amador, G. Rincón-Enríquez (2019) Girasol ornamental (var. Doble Enana) en diferentes sustratos en maceta a cielo abierto. Sometida a Revista Agroproductividad.

Vital-Vilchis I., E. E. Quiñones-Aguilar, L. V. Hernández-Cuevas, G. Rincón-Enríquez. (2019) Crecimiento de cuatro variedades de girasol ornamental micorrizadas en condiciones de campo. Sometida a Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.

Publicaciones científicas en elaboración:

Vital-Vilchis I., E. E. Quiñones-Aguilar, L. G. Hernández-Montiel, L. Moreno-Vilet, E. Hernández-Acosta; G. Rincón-Enríquez (2019) Fitorremediación de un jal de mina contaminado con metales pesados con accesiones de girasol ornamental asociado a hongos micorrízicos arbusculares.

Publicaciones de revisión científica en elaboración:

Vital-Vilchis I., E.E. Quiñones-Aguilar, G. Rincón-Enríquez (2019) La fitorremediación como alternativa para resolver contaminación por metales pesados.

DEDICATORIAS

A mi Abuelito

Te quiero mucho abuelito, gracias por estar ahí para mí, siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelitos Lázaro y Ma. Elena: Gracias por siempre interesarse por mis estudios y darme ánimos para seguir.

A mi mamá Ileana: Por protegerme, escucharme y entenderme como nadie más podría hacerlo. Por hacer hasta lo imposible sólo para hacerme sentir mejor y siempre estar a mi lado.

A mi papá Ignacio y a mi hermana Ma. Elena: Gracias por las risas y los buenos momentos en familia, por apoyarme y quererme.

Al Dr. Gabriel Rincón y a la Dra. Evangelina Quiñones: Gracias por ser mis tutores de investigación. Por el tiempo y esfuerzo invertido para sacar adelante el proyecto.

Al CONACYT: Gracias por la beca otorgada.



CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	7
AGRADECIMIENTOS.....	8
Evaluación de accesiones ornamentales de <i>Helianthus</i> spp colonizadas por hongos micorrízicos arbusculares para remediar suelos contaminados con metales pesados.....	17
RESUMEN GENERAL	17
Evaluation of ornamental accessions of <i>Helianthus</i> spp colonized by arbuscular mycorrhizal fungi to remediate soils contaminated with heavy metals	19
ABSTRACT	19
CAPÍTULO I.....	21
La fitorremediación como alternativa para resolver contaminación por metales pesados	21
INTRODUCCIÓN	21
ANTECEDENTES	22
Metales pesados.....	22
¿Qué son?.....	22
Toxicidad en plantas.....	22
Toxicidad en seres humanos.	23
Importancia de la minería en México.....	24
Problemas ambientales relacionados con la minería.....	24
Problemas sociales relacionados con la minería.....	25
Métodos de remediación de suelos contaminados con metales pesados	26
Fitorremediación como opción biológica para remediar suelos contaminados por metales pesados	29
Plantas fitorremediadoras.....	30
Plantas ornamentales para fitorremediación	31
Mecanismo de las plantas para acumular metales pesados.....	32
El girasol	33
Origen.....	33
Usos del girasol.....	33
El girasol para fitorremediación	33
Importancia de las características del suelo para el crecimiento del girasol como planta fitorremediadora.....	34
Contribución de los microorganismos en la remediación de suelos.....	34

Hongos micorrízicos arbusculares.....	35
Aspectos generales.....	35
Optimización de la fitorremediación en girasol: hongos micorrízicos arbusculares (HMA)	36
Factores que determinan la colonización : viabilidad celular	37
Mecanismos de los HMA para aumentar la tolerancia de la planta a metales pesados.	37
Perspectivas de la fitorremediación.....	37
REFERENCIAS	38
HIPÓTESIS	49
OBJETIVO GENERAL.....	49
OBJETIVOS PARTICULARES	49
CAPÍTULO II.....	50
Efecto de la composición del sustrato sobre el crecimiento del girasol ornamental (Var. Doble Enana) ..	50
RESUMEN	50
SUMMARY	51
INTRODUCCIÓN	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES	59
AGRADECIMIENTOS.....	60
REFERENCIAS	60
CAPÍTULO III.....	62
Crecimiento de girasol ornamental en maceta a cielo abierto por efecto de hongos micorrízicos arbusculares	62
RESUMEN	62
SUMMARY	63
INTRODUCCIÓN	64
MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
Variedades de girasol ornamental e inóculos de HMA	65
Condiciones ambientales durante la experimentación.....	66
Ensayo de evaluación de los HMA en el crecimiento de girasol ornamental	66
RESULTADOS	67
El crecimiento de girasol en asociación con HMA depende de la variedad vegetal	67
Las variedades ornamentales de girasol muestran una amplia plasticidad de respuesta a la inoculación con los HMA nativos mexicanos	69

La colonización micorrízica y el crecimiento vegetal están relacionados en la variedad BO.....	73
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIONES.....	74
AGRADECIMIENTOS.....	75
REFERENCIAS.....	75
RESULTADOS COMPLEMENTARIOS AL CAPITULO III.....	80
El engrosamiento del tallo es influenciado por la micorrización.....	80
La micorrización aceleró la floración en Belleza de Otoño.....	81
REFERENCIAS.....	86
CAPÍTULO IV.....	87
Viabilidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares y semillas de girasol para el establecimiento de la simbiosis micorrízica.....	87
RESUMEN.....	87
SUMMARY.....	88
INTRODUCCIÓN.....	89
El envejecimiento de las semillas consiste en el deterioro de las estructuras y funciones de la semilla con respecto al tiempo, de manera que, se va perdiendo la viabilidad (las semillas van muriendo). El envejecimiento puede ser causado por factores exógenos; por ejemplo, en semillas ortodoxas como el girasol, la temperatura y la humedad reducen la longevidad (.....)	89
MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
Determinación de la viabilidad de semillas de girasol y esporas de HMA.....	90
Simbiosis micorrízica de plantas de girasol con inóculos de HMA.....	91
RESULTADOS.....	92
DISCUSIÓN.....	95
CONCLUSIONES.....	97
AGRADECIMIENTOS.....	97
REFERENCIAS.....	97
CAPÍTULO V.....	100
RESUMEN.....	100
SUMMARY.....	101
INTRODUCCIÓN.....	102
MATERIALES Y MÉTODOS.....	104
Condiciones del experimento.....	105
Diseño experimental, de tratamientos y variables de respuesta evaluadas.....	106

Evaluación de las propiedades fisicoquímicas del jal.....	109
RESULTADOS	112
La floración es dependiente del material genético de girasol	112
El crecimiento del girasol micorrizado es influenciado por la variedad.....	113
Absorción de metales pesados.....	116
Existe interacción entre la cepa de HMA y la variedad de girasol para la cantidad de esporas y para la absorción de zinc.....	120
Condiciones fisicoquímicas del suelo del jal minero al final del experimento de fitorremediación...	127
DISCUSIÓN.....	128
CONCLUSIONES	129
REFERENCIAS.....	129
ANEXOS	135

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Efecto de los metales pesados de mayor preocupación pública en la salud según la Organización Mundial de la Salud.....	23
Figura 1. Principales estados de la república mexicana por su actividad minera, representados por cifras expresadas en millones de pesos que aportaron al producto interno bruto del país (PIB) en el 2015 (INEGI, 2015).....	24
Cuadro 2. Características de los métodos de remediación de metales pesados mas comumente empelados en las activiades humanas.....	27
Figura 2. Ilustración esquemática de los distintos métodos de remediación de suelos contaminados con metales pesados.....	29
Cuadro 3. Comparación de las ventajas y desventajas de usar la fitorremediación como técnica para remediar suelos contaminados con metales pesados.....	30
Cuadro 4. Ejemplo de plantas hiperacumuladoras de metales pesados.....	31
Cuadro 5. Mecanismos celulares de tolerancia y detoxificación de metales pesados en plantas tolerantes o hiperacumuladoras.....	32
Figura 3. Mecanismos celulares de tolerancia y detoxificación de metales pesados en plantas tolerantes o hiperacumuladoras.....	33
Figura 4. Representación gráfica de las estructuras típicas de un hongo micorrízico arbuscular en simbiosis con una raíz.....	36
Cuadro 6. Crecimiento de girasol ornamental (Var. Doble Enana) en distintos sustratos en maceta bajo condiciones de campo abierto a las 8 semanas después de establecido el experimento.....	55
Figura 5. Acumulación de peso seco de plantas de girasol ornamental (Var. Doble Enana) en distintos sustratos en maceta bajo condiciones de campo abierto a las 8 semanas después de establecido el experimento. Letras distintas en el mismo tipo de rectángulo y color indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); las barras en cada rectángulo indican el error estándar.....	55
Figura 6. Crecimiento vegetal y floral de girasoles variedad Doble Enana. (A) Sustrato 4 (Suelo: arena: agrolita: turba (30:18:2:50)), (B) Sustrato 3 (Suelo: arena: agrolita (30:18:52)).....	56
Figura 7. Comportamiento del crecimiento del girasol ornamental (Var. Doble Enano) en diferentes sustratos en maceta en condiciones a cielo abierto en la época de lluvias en instalaciones de CIATEJ en la Unidad Zapopan.....	58
Figura 8. Representación esquemática de un suelo con y sin compactación. El suelo no compactado permite la aireación, la circulación de agua y nutrientes, además tiene espacio para la expansión de las raíces. (Heilman, 1981).....	59
Cuadro 7. Crecimiento de variedades de girasol ornamental (acumulación de biomasa) inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) a los 70 días después del trasplante (época de lluvias 2017, Zapopan Jalisco).....	68
Cuadro 8. Efecto de inóculos de HMA y variedades ornamentales de girasol en el crecimiento vegetal a los 70 días después del trasplante (época de lluvias; Zapopan, Jalisco).....	71
Figura 9. Interacciones entre los factores inóculo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y variedades ornamentales de girasol en maceta a cielo abierto a los 70 días después del trasplante (época de lluvias, 2017; Zapopan, Jalisco). Variedades de girasol: GSA= Gigante doble amarilla, DE= Doble enana, DG= Doble gigante, BO= Belleza de otoño. Inóculos de HMA: Ri= Rhizophagus intraradices, Fm= Funneliformis mosseae, consorcios Cerro del Metate (CM) y Las Campesinas (LC).....	72
Cuadro 9. Peso seco en cada variedad ornamental de girasol según el inóculo del hongo micorrízico arbuscular (HMA) inoculado a los 70 días después del trasplante en maceta a cielo abierto (época de lluvias, 2017; Zapopan, Jalisco).....	72

Cuadro 10. Coeficiente de correlación (r) entre peso fresco de cada variedad de girasol y su colonización micorrízica.....	73
Figura 10. Efecto de la micorrización sobre el diámetro del tallo en plantas ornamentales de girasol en el transcurso del experimento (mediciones a las 2, 4, 6, 8 y 10 semanas). Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0.05$).....	80
Figura 11. Estado de la floración a las 6 semanas de haber inoculado las plantas con HMA dónde: 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se pueden observar los granos formados. Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$).....	81
Figura 12. Estado de la floración a las 8 semanas de haber inoculado las plantas con HMA dónde 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se pueden observar los granos formados. Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$).....	82
Figura 13. Estado de la floración a las 10 semanas de haber inoculado las plantas con HMA dónde 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se pueden observar los granos formados Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$).....	82
Figura 14. Aspecto general del experimento de girasol con distintos inóculos de hongos micorrízicos en condiciones de cielo abierto en Zapopan Jalisco, a las 3 semanas después de haber iniciado el experimento.....	84
Figura 15. Raíz de girasol doble enana colonizada por el consorcio campesinas en un experimento de micorrización en condiciones de cielo abierto, época de lluvias, Zapopan, Jalisco.....	84
Figura 16. Comparación de tratamientos de girasoles ornamentales micorrizados con distintos inóculos en condiciones de cielo abierto en Zapopan Jalisco, a las 10 semanas después de haber iniciado el experimento.....	86
Cuadro 11. Viabilidad de esporas de diferentes inóculos micorrízicos recién cosechados y con 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente.....	93
Cuadro 12. Efecto del almacenamiento a temperatura ambiente sobre la viabilidad de las esporas de hongos micorrízicos arbusculares.....	93
Cuadro 13. Porcentaje de viabilidad de las semillas de variedades ornamentales de girasol después de un año de almacenamiento.....	93
Figura 17. Esporas de hongos micorrízicos arbusculares (A) y semillas de girasol ornamental (B) después de las 24 horas de la prueba de viabilidad con el reactivo 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.....	94
Figura 18. Raíces de dos variedades de girasol ornamental inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares a los 10 y 20 días después de la inoculación (ddi) en condiciones de cielo abierto durante la estación de primavera. La flecha indica posibles esporas de HMA en proceso de germinación (Cerro del Metate en Gigante Simple Amarilla a los 10 ddi).....	95
Cuadro 14. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares sobre el crecimiento de variedades de girasol ornamental 20 días después de inoculado en condiciones de cielo abierto durante la estación de la primavera.....	94
Figura 19. Plantas de girasol establecidas en un jal que contiene metales pesados en Pachuca, Hidalgo durante la época de verano (Julio 2018) a los 20 días después del trasplante en bolsa.....	106
Cuadro 15. Diseño de tratamientos en un experimento de fitoremediación empleando plantas de girasol micorrizadas.....	107
Cuadro 16. Variables de respuesta evaluadas sobre la materia vegetal después de 40 días de exposición a los contaminantes mineros.....	107
Figura 20. Detalles de una raíz de girasol colonizada con hongo micorrízico arbuscular provenientes de un jal de mina de Pachuca Hidalgo.....	109
Figura 21. Digestión diácida de la biomasa seca de tejido de girasol para cuantificar metales pesados....	109

Cuadro 17. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de jal recolectado de la rizósfera de los tratamientos (después de 40 días de experimentación) y de una porción de jal sin tratamiento en un experimento de fitorremediación según la norma mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 Pachuca, Hidalgo.....	110
Figura 22. Método colorimétrico de Walkley y Black para determinar el contenido de materia orgánica en suelo. La muestra vira de negro (derecha) a verde bandera (izquierda) después de la titulación.....	111
Figura 23. Método colorimétrico de Olsen para cuantificar fósforo inorgánico disponible en suelo. La muestra vira de amarillo a azul intenso en presencia de fósforo.....	111
Figura 24. Densidad real de una muestra de suelo. El volumen se mide por desplazamiento de agua.....	112
Figura 25. Estado de la floración, con respecto a la variedad ornamental de girasol, a los 60 días de haber inoculado las plantas con HMA donde 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se pueden observar los granos formados, GSA= Gigante Simple amarillo y BO= Belleza de Otoño. Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$).....	113
Figura 26. Estado de la floración, con respecto a la variedad ornamental de girasol, a los 60 días de haber inoculado las plantas con HMA donde 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se ven los granos en el capítulo, GSA= Gigante Simple amarillo y BO= Belleza de Otoño. Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$).....	113
Figura 27. Planta de Girasol Gigante Simple Amarillo colonizado por HMA nativos del jal de mina histórico CEUNI en un experimento de fitorremediación en condiciones de cielo abierto en Pachuca, Hidalgo.....	114
Cuadro 18. Crecimiento vegetal de los distintos tratamientos 60 días después de la inoculación con HMA (40 días del trasplante en un jal minero) en tiempos de lluvia, Pachuca, Hidalgo. CM= Cerro del Metate, FM= Funneliformis mosseae, HMA= hongo micorrízico arbuscular, BO= Belleza de Otoño, GSA= Gigante Simple Amarilla.....	115
Cuadro 19. Acumulación de biomasa seca vegetal de los distintos tratamientos 60 días después de la inoculación con HMA (40 días del trasplante en un jal minero) en tiempos de lluvia, Pachuca, Hidalgo. CM= Cerro del Metate, FM= Funneliformis mosseae, HMA= hongo micorrízico arbuscular, BO= Belleza de Otoño, GSA= Gigante Simple Amarilla.....	116
Cuadro 20. Acumulación de metales pesados en diferentes variedades de girasol ornamental micorrizado en un experimento de fitorremediación en el jal histórico CEUNI (época de lluvias Pachuca, Hidalgo).....	117
Figura 29. Extracción de plomo (Pb) por distintos materiales genéticos de girasol asociados con hongos micorrizicos arbusculares (HMA) en el jal histórico CEUNI ubicado en Pachuca Hidalgo en un experimento de fitorremediación en época de lluvias (28 de junio al 8 de agosto 2018). CM= Cerro del Metate, FM= Funneliformis mosseae, GSA= Gigante Simple Amarilla. Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0.05$).	118
Figura 30. Extracción de zinc (Zn) por distintos materiales genéticos de girasol asociados con hongos micorrizicos arbusculares (HMA) en el jal histórico CEUNI ubicado en Pachuca Hidalgo en un experimento de fitorremediación en época de lluvias (28 de junio al 8 de agosto). CM= Cerro del Metate, FM= Funneliformis mosseae, GSA= Gigante Simple Amarilla. Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0.05$).....	119
Figura 31. Comportamiento de los pesos secos de distintos materiales genéticos de girasol asociados con hongos micorrizicos arbusculares (HMA) en el jal histórico CEUNI ubicado en Pachuca Hidalgo en un experimento de fitorremediación en época de lluvias (28 de junio al 8 de agosto) CM= Cerro del Metate, FM= Funneliformis mosseae, GSA= Gigante Simple Amarilla. Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0.05$).....	120
Cuadro 21. Efecto de inóculos de HMA y variedades ornamentales de girasol en el crecimiento vegetal a los 60 días después de inoculación con HMA y 40 días después del trasplante en un jal minero en Pachuca, Hidalgo.....	121

Cuadro 22. Efecto de inóculos de HMA y variedades ornamentales de girasol en la generación de biomasa seca a los 60 días después de inoculación con HMA y 40 días después del trasplante en un jal minero en Pachuca, Hidalgo.....	122
Figura 31. Interacción entre el factor número de esporas de cada inóculo de HMA y el factor variedad de girasol a los 40 días después de iniciado el experimento de fitorremediación (28 de junio al 8 de agosto 2018; Pachuca, Hidalgo).....	122
Cuadro 23. Absorción de Pb y Zn por diferentes variedades de girasol colonizadas con HMA en un experimento de fitorremediación en Pachuca, Hidalgo.....	123
Figura 32. Interacción entre el factor concentración de Zn en biomasa (mg de Zn sobre Kg de biomasa) acumulado por cada inóculo de HMA y el factor variedad de girasol a los 40 días después de iniciado el experimento de fitorremediación (Pachuca, Hidalgo)	124
Figura 33. Interacción entre el factor variedad de girasol ornamental y el factor cepa de HMA con respecto a la traslocación (concentración de metal de órganos aéreos/ concentración de metal de raíces) de zinc 40 días después de iniciado el experimento.....	124
Figura 34. Interacción entre el factor variedad de girasol ornamental y el factor cepa de HMA con respecto a la traslocación (concentración de metal de órganos aéreos/ concentración de metal de raíces) de plomo 40 días después de iniciado el experimento.....	125
Cuadro 24. Absorción de Zn (mg/kg) en distintas variedades de girasol inoculados con HMA y sin inocular en un experimento de fitorremediación Pachuca, Hidalgo.....	125
Cuadro 25. Absorción de Pb (mg/kg) en distintas variedades de girasol inoculados con HMA y sin inocular en un experimento de fitorremediación Pachuca, Hidalgo.....	125
Cuadro 26. T de student para Zn y Pb entre raíz y tallo de toda la población.....	126
Cuadro 27. Absorción de metal total por planta (AMT) (mg de metal por planta). En un experimento de fitorremediación en el jal histórico CEUNI en Pachuca, Hidalgo.	126
Cuadro 28. Condiciones físicoquímicas del suelo al final del experimento (40 días después de establecido el experimento de fitorremediación). Para cada tratamiento se midió PH, conductividad (C), cantidad de fósforo inorgánico (P) en mg/g, el porcentaje de materia orgánica, densidad aparente (g/ml), densidad real (g/ml), concentración de plomo (mg/kg) y concentración de zinc (mg/kg).....	127

Evaluación de accesiones ornamentales de *Helianthus* spp colonizadas por hongos micorrízicos arbusculares para remediar suelos contaminados con metales pesados

RESUMEN GENERAL

México es un país líder en minería que en el 2010 se reportó como segundo lugar a nivel mundial en producción de plata, bismuto y fluorita. También destaca en la producción de arsénico, plomo, cadmio, antimonio, zinc, barita, grafito, yeso y otros. Los minerales se extraen y se concentran con métodos físicos mientras que los materiales con baja concentración de metal se retiran en forma de lodos, llamados jales, que contienen altas cantidades de metales pesados como As, Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, etc. Dichos jales se acumulan en grandes pilas donde el aire y la lluvia esparcen la contaminación. La fitorremediación es una técnica biológica que utiliza plantas para estabilizar, volatilizar o extraer los metales pesados del suelo ó agua. La fitorremediación asistida consiste en utilizar microorganismos de la rizósfera que facilitan la extracción del metal por la planta. Con el objetivo de evaluar la capacidad fitoextractora de distintas accesiones ornamentales de *Helianthus* spp, tanto silvestres como cultivadas, asociadas con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) como alternativa para la remediación de un jal minero contaminado con metales pesados se realizaron varios experimentos donde se evaluó : 1) Efecto de la composición del sustrato sobre el crecimiento de Girasol ornamental variedad Doble enana, 2) Viabilidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares y semillas de girasol para el establecimiento de la simbiosis micorrízica, 3) Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento de plantas de girasol ornamental y 4) Fitorremediación de un jal de mina contaminado con metales pesados utilizando accesiones de girasol ornamental asociados a hongos micorrízicos arbusculares. Los resultados arrojaron que el sustrato suelo: arena :agrolita:turba (30:18:2:50) (%/v) proporciona las propiedades físicoquímicas más apropiadas para el crecimiento óptimo del girasol ornamental (Var. Doble Enana). Por otro lado, las esporas de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares almacenados hasta por 2 años pueden ser usados para colonizar plantas porque conservan su viabilidad, pero es necesario realizar más estudios para determinar el tiempo que tardan en colonizar girasol ornamental; las semillas de

girasol pierden rápidamente su viabilidad y esto depende del genotipo.

Los resultados también arrojaron que cada cepa de HMA puede establecer una relación de tipo mutualista, parasítica o no mostrar efectos sobre el crecimiento de las variedades ornamentales de *H. annuus* ya que existe una interacción variedad-cepa.

Finalmente, se encontró que Gigante Simple Amarillo colonizado con *Funneliformis mosseae* absorbió 40% más Zn que su control y la colecta sel25 colonizada con Cerro del Metate absorbió 55% más Zn que su control mientras que BO-FM absorbió 84% más de Pb que su control. Sin embargo, Gigante Simple Amarillo colonizado por Cerro del Metate es el tratamiento que absorbió más Zn y Pb de forma general.

De este trabajo se concluye que para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados usando *Helianthus* spp. Colonizado con HMA se debe tomar en cuenta el tipo de sustrato/suelo en el que se desarrolla la planta, el tiempo de almacenamiento de las semillas y esporas utilizadas, la interacción planta- cepa de hongo y el tipo de contaminante.

Palabras clave: fitorremediación, minería, jal minero, contaminación, fitoextracción asistida por microorganismos, micorrizas.

Dra. Evangelina Quiñones Aguilar	equinones@ciatej.mx
Dr. Gabriel Rincón Enríquez	grincon@ciatej.mx
Ing. Isabel Vital Vilchis	ivv0211@hotmail.com
Dr. Cecilia Guízar González	cguizar@ciatej.com
Dr. Jhony Navat Enríquez Vara	jenriquez@ciatej.com

Evaluation of ornamental accessions of *Helianthus* spp colonized by arbuscular mycorrhizal fungi to remediate soils contaminated with heavy metals

ABSTRACT

Mexico is a leader mining country that in 2010 was reported as second place in silver, bismuth and fluorite worldwide production. It also stands out for its production of arsenic, lead, cadmium, antimony, zinc, barite, graphite, gypsum and others. These minerals are extracted and concentrated through physical methods while the left portion with low mineral content is piled up in what is called mine tailings, which contain high amounts of heavy metals such as As, Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, etc. Wind and rain spread the contamination out from these mine tailings. Phytoremediation is a biological technique that utilizes plants to stabilize, volatilize or extract heavy metals from soil and water. Assisted phytoremediation consists in the use of microorganisms from the rhizosphere to enhance plant's metal extraction from soil. With the objective of evaluating the phytoextraction capacity of different *Helianthus* spp. ornamental accessions (both cultured and wild) associated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) as an alternative to remediate a mine tailing contaminated with heavy metals, the following aspects were evaluated: 1) Effect of the substrate composition over sunflower variety Doble enana growth, 2) Viability of arbuscular mycorrhizal fungi spores and of sunflower seeds for the establishment of the mycorrhizal symbiosis. 3) Effect of arbuscular mycorrhizae fungi over ornamental sunflower growth and 4) Phytoremediation of a mine tailing contaminated with heavy metals using ornamental sunflower accessions associated with arbuscular mycorrhizae fungi. Results showed that the substrate containing soil: sand: agrolite: peat moss (30:18:2:50) (%/v) provide the ideal physical and chemical properties for the optimal sunflower growth (Var. Doble Enana). In the other hand, arbuscular mycorrhizae fungi spores keep their viability after two years of storage and can be used to colonize plants, but it is necessary further research to determine the time needed for the colonization in ornamental sunflower to take place; Sunflower seeds lose their viability quickly and it is genotype-dependant. Results also showed

that each AMF strain can establish a mutualistic, parasitic or show no effect over ornamental *H. annuus* due to AMF strain and sunflower variety interactions.

To end up with, it was found that Gigante Simple Amarillo with *Funneliformis mosseae* absorbed 40% more than the control treatment and the wild accession sel25 colonized with consortium Cerro del Metate absorbed 55% more than the control treatment while Belleza de Otoño with *Funneliformis mosseae* absorbed 84% more Pb than the control treatment.

From this work it is concluded that, in order to make phytoremediation of contaminated soils with heavy metals using *Helianthus* spp., the following must be taken into account: substrate/soil type given that the plant is sensitive to non-porous soils, time of storage of seeds and spores given that storage is directly related with viability and colonization capability, the interaction plant-AMF because some symbiosis relationships cannot be favorable for plant growth and the type of contamination.

Index words: phytoremediation, mining, mine tailing, contamination, assisted phytoextraction with microorganisms, mycorrhiza.

CAPÍTULO I

La fitorremediación como alternativa para resolver contaminación por metales pesados

Phytoremediation as an alternative to solve contamination by heavy metals

Isabel Vital-Vilchis¹, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar¹, Gabriel Rincón-Enríquez^{1, *}

¹Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México, C.P. 45019. Tel. (33) 33455200.

*Autor para correspondencia (grincon@ciatej.mx)

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados forman un tipo de contaminación inorgánica que se presenta en todo el mundo y que amenaza con la salud tanto humana como ambiental (Hassan et al., 2013). Los metales migran de los sitios contaminados a los no- contaminados por medio del aire (en el polvo) o por lixiviados del suelo y aguas residuales (Khan et al., 2000). En un reporte del 2010, la organización mundial de la salud (WHO) enlistó los 10 compuestos químicos de mayor preocupación pública para la salud y entre ellos se encuentran el arsénico, el plomo, el mercurio y el cadmio. En México, la gran actividad minera genera problemas de contaminación por los residuos de elementos traza que se producen secundariamente como resultado de la extracción de metales preciosos. Los métodos para descontaminar se dividen en químicos, físicos y biológicos. La fitorremediación es un método biológico que utiliza plantas metalofitas (tolerantes a metales pesados) para removerlos del medio ambiente. La fitorremediación es un método, a comparación de los químicos y físicos, bajo en costos y amigable con el medio ambiente. *Helianthus annuus* L. comúnmente llamada girasol, es una planta de especial interés para estos

finas porque es una planta hiperacumuladora capaz de almacenar una gran variedad de metales como el Cd, Pb, Cu, Cr y hasta el uranio. Una de las principales limitaciones de la fitorremediación es que la contaminación debe de ser baja (de acuerdo con la tolerancia de la planta usada). Por eso se recomienda usar microorganismos como las micorrizas que tienen mecanismos para aumentar la tolerancia de la planta a la contaminación.

ANTECEDENTES

Metales pesados

¿Qué son?

Se les llaman metales pesados a los elementos que en su forma elemental tienen una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 o cuyo número atómico es superior a 20 excepto a los metales alcalinos y alcalinotérreos. Sin embargo, el término es comúnmente usado para todos los metales que son tóxicos para la célula y se suelen englobar también elementos como: As, B, Ba y Se (Navarro-Aviño, 2007).

Toxicidad de los metales pesados

Toxicidad en plantas

Con base en las características físicas y químicas de los metales pesados, se distinguen principalmente 3 mecanismos de toxicidad en planta: 1) producción de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la autooxidación y de la reacción de Fenton (reacción típica de los metales de transición como el Cu y el Fe). 2) Bloqueo de grupos funcionales en biomoléculas. 3) Desplazamiento de los metales esenciales de las biomoléculas (Schützendübel y Polle, 2002). Todas estas causando gran daño; el Cadmio, por ejemplo, desarrolla una cadena de reacciones que inhiben el crecimiento de la planta: estimula la lignificación, reduce el contenido de clorofila y de proteínas y eventualmente causa la muerte celular (Hashem *et al.*, 2016; Schützendübel y Polle, 2002). El Cr, por otro lado, causa problemas en la germinación y en el crecimiento; interfiere en la fotosíntesis, absorción de agua y en la nutrición (Shanker *et al.*, 2005).

Toxicidad en seres humanos.

En caso de los humanos, también están altamente relacionados con la generación de radicales libres y la disminución de actividad de las enzimas antioxidantes desencadenando un estrés oxidativo celular (Nava-Ruíz y Méndez-Armenta, 2011) y en consecuencia, problemas de salud; el plomo, por ejemplo, causa síntomas como retraso del crecimiento e impacto al sistema nervioso (Alvarado *et al.*, 2011).

En un reporte del 2010, la organización mundial de la salud (WHO) enlistó los 10 compuestos químicos de mayor preocupación pública para la salud y entre ellos se encuentran el arsénico, el plomo, el mercurio y el cadmio. Los problemas asociados a la exposición de estos contaminantes, así como la forma de exposición y la fuente se ilustran en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Efecto de los metales pesados de mayor preocupación pública en la salud según la Organización Mundial de la Salud.

Metal	Exposición humana	Problema de salud	Fuente de contaminación
Hg	Consumo de pescado contaminado u otros alimentos	Mal desarrollo del feto, toxicidad en sistema nervioso, digestivo e inmune; daño en riñones, piel, ojos, pulmones	Quema de hulla, minería
Cd	Comida contaminada como moluscos y crustáceos, fumar	Carcinogénico, problemas de riñones y sistema respiratorio	Minería, incineración de basura, combustión de combustible
Pb	Inhalar aire contaminado, tomar agua de tuberías de plomo	Mal desarrollo del cerebro y sistema nervioso en niños, daño de riñón, presión alta acumulación en huesos	Manufactura de baterías para autos, reciclaje
As	Beber agua contaminada	Cáncer, daño en piel, sistema cardiovascular, diabetes, neurotoxicidad	Presente naturalmente en aguas subterráneas

Fuente: World Health Organization, 2016.

Resulta interesante mencionar que se ha visto que la exposición a metales pesados causa problemas más serios en mujeres que en hombres; se ha observado en la mujer más prevalencia de nickel y de cadmio (la enfermedad de Itai-itai por intoxicación de cadmio se presentaba principalmente en mujeres) y de Pb en mujeres en la menopausia (Vahter *et al.*, 2002).

El Cd se retiene en el riñón de las personas, entre 10 y 30 años en promedio (Jarup y Akesson, 2009).

Importancia de la minería en México

México es un país líder en minería que en el 2010 se reportó como segundo lugar a nivel mundial en producción de plata, bismuto y fluorita. También destacan en la producción de arsénico, plomo, cadmio, antimonio, zinc, barita, grafito, yeso y otros (INEGI, 2010). La minería contribuye con el 4 por ciento del Producto Interno Bruto nacional y los estados, actualmente, que sobresalen a nivel nacional por su actividad minera son Zacatecas, Durango, Chihuahua, Sonora y otros (INEGI, 2015) (**Figura 1**).



Fuente : INEGI. Cifras preliminares expresadas en millones de pesos a precios de 2008.

Figura 1. Principales estados de la república mexicana por su actividad minera, representados por cifras expresadas en millones de pesos que aportaron al producto interno bruto del país (PIB) en el 2015 (INEGI, 2015).

Problemas ambientales relacionados con la minería

La contaminación por metales pesados se reporta en muchas partes de México existiendo tanto contaminación de fuentes naturales, por ejemplo, el arsénico, que se ha reportado en el agua subterránea de la corteza terrestre (World Health Organization, 2016), como

contaminación por actividades del hombre.

En el caso de la minería, los minerales se extraen y se concentran al utilizar métodos físicos, posteriormente se separa la fracción económicamente redituable por gravimetría. Los materiales con baja concentración de metal se retiran en forma de lodos, llamados jales, que contienen altas cantidades de elementos potencialmente tóxicos (EPT). Estos generalmente son sulfuros metálicos como pirita (FeS_2), pirrotita ($(\text{Fe}_{1-x}\text{S})$), galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS_2) y arsenopirita (FeAsS), que contienen, entre otros elementos, As, Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, etc (Romero *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2008).

En sequía el viento arrastra los jales mineros causando que los elementos traza se dispersen por el ambiente, convirtiéndose en un foco de contaminación (dispersión eólica). Mientras que, en lluvias, la problemática se asocia con la generación de lixiviados ácidos y su dispersión a través de los escurrimientos superficiales (dispersión hídrica) (Romero *et al.*, 2008; Ruiz-Huerta y Armienta-Hernández, 2012; Sommer *et al.*, 2000). Estas dos formas de dispersión causan que en lugares como el sitio minero Villa de la Paz-Matehuala, San Luis Potosí se hayan encontrado contaminación de estos metales pesados en un área de 105 km^2 tanto en suelo como en estanques pluviales donde la concentración de arsénico excede 5 veces el nivel de arsénico permitido para el agua potable en México (Razo, 2004). Otros ejemplos de sitios contaminados de metales pesados por acción de la minería y la metalurgia son La Comarca Lagunera (parte en Coahuila y parte en Durango), San Francisco de oro en Chihuahua (Ortiz-Cano *et al.*, 2009; Puga *et al.*, 2006) y El Triunfo en Baja California Sur (Marmolejo-Rodríguez *et al.*, 2011) por mencionar algunos.

Respecto a los cuerpos de agua, el río Lerma es uno de los cuerpos de agua más contaminados de México, dicha contaminación incluye metales como el Cr, Mn, Fe, Cu, Zn y Pb por lo que hay baja biodiversidad en la zona (Lango-Reynoso, 2010; Zarazúa *et al.*, 2011).

Problemas sociales relacionados con la minería

Como se mencionó anteriormente, la minería es una fuente importante de contaminación y México es un país altamente minero, pero, además de los conflictos ambientales, se tienen un descontento social ya que las mineras se establecen frecuentemente en zonas de pobreza donde

se practica la agricultura, la pesca y la ganadería. La industria minera requiere de grandes cantidades de agua y tierra por lo que hace que las comunidades sufran de escasez de recursos para cumplir sus necesidades básicas. También hay casos en los que sí hay agua, pero está contaminada ya que las mineras tiran accidental o deliberadamente sus residuos en ríos, lagunas, napas subterráneas etc., dejando a las comunidades expuestas a cianuro, Pb, Cd, As, Hg, Fe, Mn, Se, etc (Hilson, 2002; Saade, 2013).

Además, los metales en agua, tierra y aire eventualmente son acumulados por los organismos viviendo en dicho ecosistema y de ser consumido por los humanos, dañan la salud humana. Muchos estudios comprueban lo anterior. Se reporta que la acumulación de cadmio en la ostra *Crassostrea virginica* Gmelin alcanzó niveles de riesgo para la salud humana en el sistema lagunero Tamiahua en Veracruz (Lango-Reynoso *et al.*, 2010). Los árboles acumulan metales en sus hojas en zonas tanto industrial como comercial y residencial (de especial relevancia el ciprés) (Alcalá *et al.*, 2008). En lugares como el Valle de Mezquital (Hidalgo) donde se utilizan las aguas residuales para la agricultura, se corre el riesgo de contaminar los cultivos porque se ha comprobado que cultivos como la alfalfa y el maíz también pueden acumular metales en órganos aéreos (Lara-Viveros *et al.*, 2015).

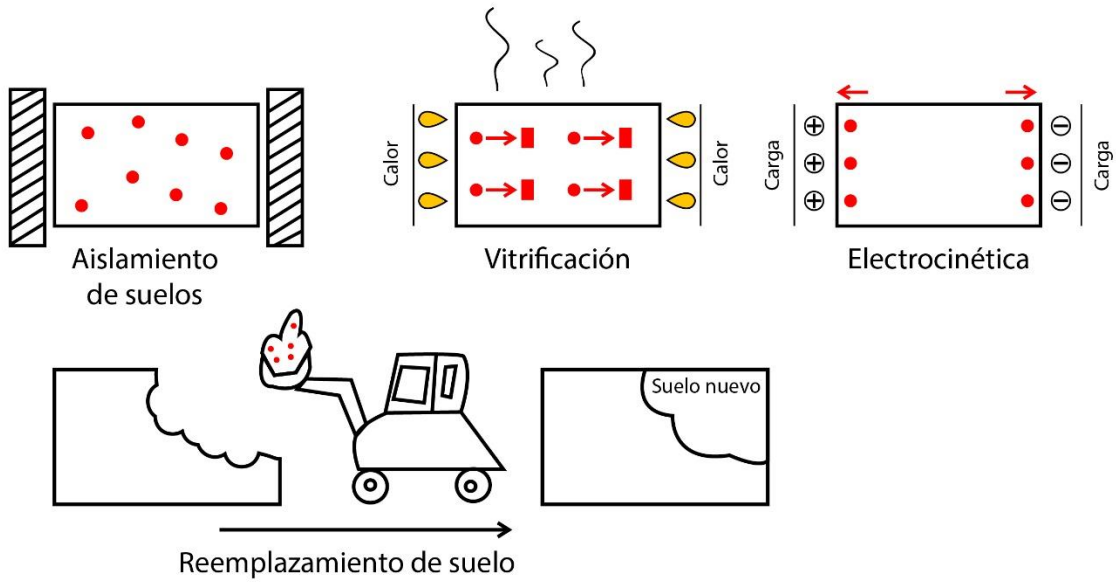
Métodos de remediación de suelos contaminados con metales pesados

El problema para remediar un ecosistema contaminado con metales pesados reside en que éstos, a diferencia de los contaminantes orgánicos, no se pueden degradar, lo cual los hace persistir en el ecosistema. Por ejemplo, el Pb puede ser retenido en el suelo de 150 a 5000 años (Khalid *et al.*, 2016; Shaw, 1990). La remediación convencional de éstos está basada en diversos métodos físicos, químicos y biológicos, los cuales se mencionan en el **Cuadro 2** y la **Figura 2**, así como la combinación de varios de estos que tienen como objetivo llevar la concentración de metales a un nivel aceptable (Khalid *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Características de los métodos de remediación de metales pesados mas comumente empelados en las activiades humanas.

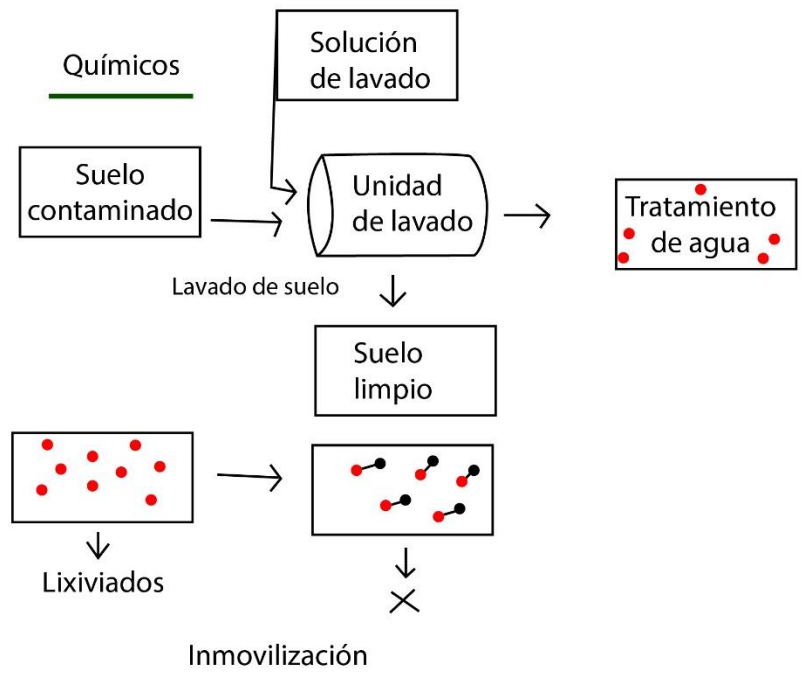
Tipo	Característica	Descripción	Definición
Química	Rápido, depende del tipo de suelo, del metal y del químico	Inmovilización	Agregar agentes que generan compuestos estables e inmóviles
		Lavado de suelo	Remover los metales haciendo extracciones con solventes (orgánicos u inorgánicos)
Física	Laborioso y costoso. Ideal para sitios altamente contaminados	Aislamiento de suelo	Poner barreras subterráneas alrededor del sitio contaminado para que la contaminación no se extienda
		Vitrificación	Calentamiento del suelo contaminado a alta temperatura para conseguir su fusión y transformación en un material vitreo. Baja así la biodisponibilidad del contaminante
		Electrocinética	Se extraen los contaminantes por electro migración aplicando una carga
		Reemplazamiento de suelo	Remover el suelo y poner suelo limpio. El suelo contaminado es descontaminado o llevado a un lugar diferente
Biológica	Amistoso con el ambiente, pero tardado. Ideal para sitios no tan contaminados	Fitoestabilización	Secuestro de metales por la raíz reduciendo su biodisponibilidad
		Fitoextracción	Almacenamiento de metales en órganos aéreos de la planta
		Fitovolatilización	Absorción de metales por la planta y liberación al ambiente en forma gaseosa (Hg y Se)
		Fitoextracción asistida por microorganismos	Uso de microorganismos para mejorar la absorción de metales por las plantas

Fuente: recuperado y modificado de Khalid *et al.* (2016).



Físicos

Proteínas nuevas



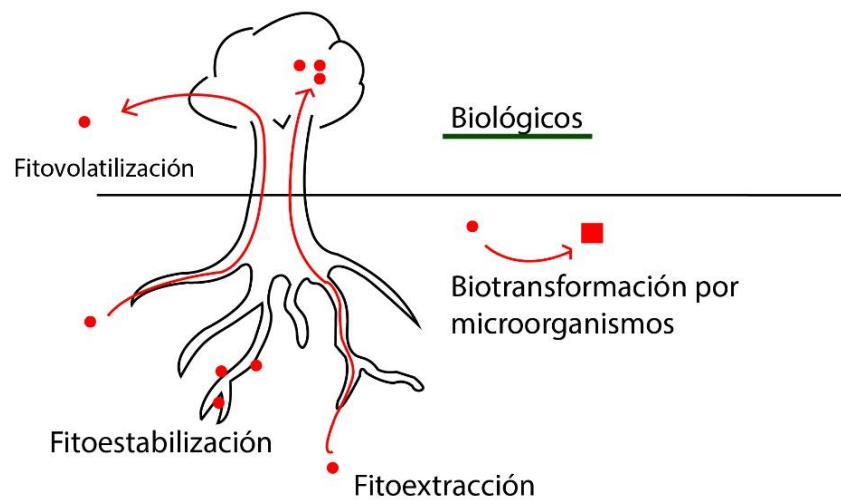


Figura 2. Ilustración esquemática de los distintos métodos de remediación de suelos contaminados con metales pesados.

Fitorremediación como opción biológica para remediar suelos contaminados por metales pesados

La fitorremediación es una técnica *in situ* en la que se utiliza plantas para remover, estabilizar o transformar compuestos contaminantes de los ecosistemas. Se puede fitorremediar el suelo, aire, sedimentos y aguas (Garbisu *et al.*, 2007).

Dependiendo del tipo de contaminante y el sitio, la fitorremediación ocurre a través de diferentes procesos. Para contaminantes orgánicos, por ejemplo, destaca la fitodegradación (transformación o mineralización del compuesto por el metabolismo de la planta) (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). En el particular caso de los metales pesados, se habla de plantas hiperacumuladoras que son aquellas capaces de almacenar grandes cantidades de metal en sus órganos aéreos sin intoxicarse (Rascio y Navari-Izzo, 2010) así como también se puede hablar de la rizofiltración (el uso de las raíces de las plantas para remover metales del agua), de la fitoestabilización (interacción del compuesto metálico con la planta para eliminar la biodisponibilidad de este) (Salt *et al.*, 1995) y de fitovolatilización que consiste en la transformación de compuestos volátiles a formas menos tóxicas (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012).

Las principales ventajas y desventajas de utilizar esta técnica en suelos se muestran en el **cuadro 3**.

Cuadro 3. Comparación de las ventajas y desventajas de usar la fitorremediación como técnica para remediar suelos contaminados con metales pesados.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Tiene menores costos que otras técnicas porque no implica que el suelo sea transportado y porque su fuente de energía es el sol • Además de remediar, mejora las propiedades físicas y químicas del suelo • La recuperación de metales trazas raros a partir de la biomasa cosechada (fitominería) 	<ul style="list-style-type: none"> • Resultados a largo plazo • Los niveles de contaminante deben ser bajos (dentro del rango de tolerancia de la planta) • Los contaminantes deben ser de baja movilidad para evitar la lixiviación

Fuentes: Carpena y Bernal, 2007; Leewis *et al.*, 2013; Mirza *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2000.

Plantas fitorremediadoras

Para considerarse una planta como hiperacumuladora, debe acumular 100 veces más metal que aquellos típicamente considerados como no acumuladoras. Un hiperacumulador concentrará más de 10 µg/g Hg; 100 µg/g Cd; 1000 µg/g Co, Cr, Cu, y Pb; 10 000 µg/g Zn y Ni (Boyda, 2008).

Más de 400 especies de plantas han sido identificadas con potencial hiperacumulador de metales para agua y suelo. Las familias que encabezan esta lista son las Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cunouniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae y Euphobiaceae (Lone *et al.*, 2008; Prasad y Freitas, 2003). Ejemplos de estas plantas se presentan en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Ejemplo de plantas hiperacumuladoras de metales pesados.

Nombre científico	N. común	Metal pesado	Cita
Cipres	Cipres	Ni, Co, V, Ti	Alcalá <i>et al.</i> , 2008
<i>Brassica juncea</i>	Mostaza de la India	Pb, Cr, Ni, Zn, Cu	Nanda Kumar, 1995
<i>Thlaspi caerulescens</i> <i>T.goesingense</i> <i>T.ochroleucum</i> <i>T.rotundifolium</i>	Viola	Zn, Cd, Ni, Pb	Becerril <i>et al.</i> , 2007
<i>Rumex acetosa</i>	Acedera común	Zn, Pb	Becerril <i>et al.</i> , 2007
<i>Alyssum L.</i>	Aliso de mar	Ni	Kidd <i>et al.</i> , 2007
<i>Pteris vittata</i>	Helecho de lima	Cd, As	Xiao <i>et al.</i> , 2008
<i>Eleocharis macrostachya</i>	Spikerush pálido	As	Nuñez-Montoya <i>et al.</i> , 2007
<i>Schoenoplectus americanus</i>	Totora	As	Nuñez-Montoya <i>et al.</i> , 2007
<i>Brachiaria dictyoneura</i>	Pasto llanero	Hg, Cd	Arroyave <i>et al.</i> , 2010
<i>Helianthus tuberosus</i>	Alcachofa de Jerusalén	Cd	Long <i>et al.</i> , 2014
<i>Lemna minor</i>	Lenteja de agua	Hg	Arenas <i>et al.</i> , 2011

Para que una planta sea ideal para fitorremediación se busca: rápida tasa de crecimiento, alta producción de biomasa, raíces moderadamente largas, fácil de cosechar y tolerancia a una gran variedad de metales pesados (Sood *et al.*, 2012); siendo importante mencionar que dentro de una especie se debe tomar en cuenta las variaciones genéticas entre poblaciones como variable del rendimiento de acumulación (Henson, 2013; Long *et al.*, 2014).

Plantas ornamentales para fitorremediación

Varios estudios sugieren el uso de determinadas especies ornamentales como alternativa para recuperar o cubrir con vegetación sitios contaminados: Caselles *et al.* (2002) evaluaron la acumulación de elementos traza (Al, Fe, Pb, Mn, Cu, Zn) en petunia provenientes de la contaminación del aire causado por las emisiones vehiculares en zonas urbanas. Mientras Rodríguez-Elizalde *et al.* (2010) sugieren el uso de *Dahlia x hortorum* Willd. (dalia), *Tagetes erecta* L. (tagetes) y *Cosmos bipinnatus* Cav. (cosmos) como fitorremediadoras capaces de acumular Cu, Cd, Ni, Pb provenientes de suelos mineros y Sharma *et al.* (2004) estudiaron el efecto de los metales pesados sobre la germinación de plantas ornamentales.

Mecanismo de las plantas para acumular metales pesados

La mayoría de las plantas metalofitas (resistentes a los metales) consiguen su tolerancia restringiendo fisiológicamente la entrada del contaminante a sus raíces (Emamverdian *et al.*, 2015; Kidd *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2005) Sin embargo, las plantas hiperacumuladoras cuentan con mecanismos para mitigar el estrés por metales pesados acumulados en sus órganos; principalmente por medio de quelación, compartimentalización, reparación y exclusión (**Cuadro 5, Figura 3**).

Cuadro 5 .Mecanismos celulares de tolerancia y detoxificación de metales pesados en plantas tolerantes o hiperacumuladoras.

Mecanismo	Descripción
Quelación	Algunas plantas pueden integrar metales en su citoplasma por medio de transportadores de membrana. Una vez adentro los detoxifican al unirlos con ligandos como las fitoquelatinas, metalotioneinas o con proteínas aglutinantes de metales. También se pueden detoxificar afuera de la célula usando exudados como proteínas y ácidos orgánicos (Hall, 2012; Xie <i>et al.</i> , 2015)
Compartimentalización	Consiste en guardar el metal en las vacuolas a través de transportadores de tonoplastos (Hall, 2012). Otros organismos como los hongos micorrízicos arbusculares pueden compartimentalizar metales en el citoplasma de sus esporas como estrategia para sobrevivir (Cornejo <i>et al.</i> , 2013)
Reparación	Consiste en reparar las proteínas que han sido dañadas por el estrés oxidativo. Para esto se expresan proteínas de choque térmico y de respuesta a estrés (Hall, 2012) así como proteasas para eliminar las proteínas dañadas y promover la producción de nuevas (Pena <i>et al.</i> , 2006)
Exclusión	Consiste en reducir el flujo de entrada a la célula ó unir el metal a la membrana plasmática para evitar que entre (Hall, 2012)

En determinadas especies de plantas es probable que existan mecanismos utilizados para la extracción de metales específicos. También es probable que más de un mecanismo sea utilizado para detoxificar un solo metal (Hall, 2012).

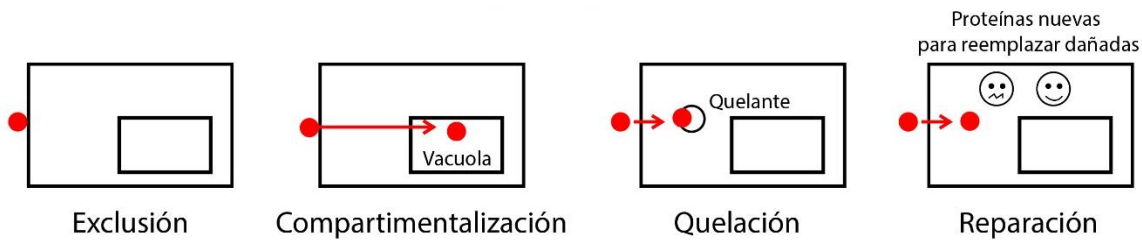


Figura 3. Mecanismos celulares de tolerancia y detoxificación de metales pesados en plantas tolerantes o hiperacumuladoras.

El girasol

Origen

Helianthus annuus L, comúnmente llamada girasol, pertenece a la familia Asteraceae. El análisis de documentos históricos y semillas descubiertas en Tabasco y Morelos, indican que los girasoles cultivados fueron importantes durante la época prehispánica y del virreinato en el centro de México. A pesar de que las plantas silvestres son genéticamente distantes de los cultivares comerciales contemporáneos, las evidencias indican a México como el centro de origen y domesticación de la especie (Bye *et al.*, 2009).

Usos del girasol

Las variedades de girasol pueden emplearse: 1) como fuente de semillas comestibles o para obtención de aceite; en general, estas plantas son monocefálicas (con un solo tallo y una cabezuela principal); 2) para fines ornamentales, las que pueden ser policefálicas (con varias cabezuelas) con una “flor” apical dominante y pocas pequeñas “flores” laterales dispuestas en racimos cerca del ápice (Bye *et al.*, 2009); 3) El uso de plantas ornamentales para fitorremediación de suelos es una opción nueva (Xiu-Zhen *et al.*, 2012).

El girasol para fitorremediación

Un estudio en hidroponía de la variedad sundance girasol demostró la absorción de una gran variedad de metales en el siguiente orden: $Cd = Cr > Ni$, $Cr > Cd > Ni > As$ y $Fe \gg As > Cd > Ni > Cr$. Los metales se acumulan en diferentes partes de la planta: el cobre se almacena

principalmente en raíces mientras que el Cd y Ni pueden ser traslocados a partes aéreas (January *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2003). El girasol, puede incluso acumular Pb, U¹³⁷, Cs y Sr⁹⁰ (Prasad y Freitas, 2003; Shahandeh y Hossner, 2002). Lo anterior es consistente con el estudio que recomienda el uso de girasol para limpiar aguas residuales de Pb, Cu y Cd (Nathan *et al.*, 2012). La acumulación de metales va disminuyendo con el tiempo, lo que implica que su capacidad de fitorremediar es mayor en las etapas tempranas del desarrollo (Adesodun *et al.*, 2010).

Estudios sugieren que los girasoles tienen un sistema de proteasas que degradan las proteínas que han sido oxidadas por metales pesados, removiendo los fragmentos tóxicos y promoviendo la síntesis de nuevas proteínas (Pena *et al.*, 2006).

Además del almacenamiento de metales, *Helianthus annuus* puede fitorremediar otros compuestos; Gujarathi *et al.* (2005) encontraron que las raíces excretan metabolitos secundarios que pueden degradar los antibióticos tetraciclina y oxytetraciclina que son contaminantes cuando están en el medio ambiente. Mientras que Castro *et al.* (2003) observó que la planta metaboliza benzotriazoles y sus derivados.

Importancia de las características del suelo para el crecimiento del girasol como planta fitorremediadora.

Los suelos altamente compactados alteran la estructura del suelo y la hidrología al aumentar la densidad de este y bajar su porosidad (Kozlowski, 1999; Popova *et al.*, 2016). La compactación causa problemas fisiológicos en las plantas ya que afecta el crecimiento de las raíces y en consecuencia la absorción de agua y nutrientes (Unger y Kaspar, 1993). Hablando de fitorremediación, se puede inferir que la absorción de contaminantes por la planta también es afectado por este tipo de suelo. Hacen falta estudios para determinar la sensibilidad del girasol a la composición del suelo.

Contribución de los microorganismos en la remediación de suelos

Además de las plantas, los microorganismos como muchas levaduras, hongos, algas, bacterias y flora acuática tienen la capacidad de acumular metales dentro de la estructura

microbiana. Por otro lado, se puede hablar de biosorción de metales por los microorganismos que se refiere a la captación de estos por medios físicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico (Cañizares-Villanueva, 2000).

A la adición de cepas microbianas con atributos especiales para degradar contaminantes se le llama bioaugmentación (Baneshi *et al.*, 2014), mientras que la sola adición de nutrientes al suelo para estimular que los microorganismos ya presentes en el ecosistema se multipliquen y degraden contaminantes se le llama bioestimulación (Olguín *et al.*, 2007).

Las plantas combinadas con microorganismos de la rizosfera (rhizobacterias) aumentan la eficiencia de la fitorremediación (también llamado rhizoremediación) (Baneshi *et al.*, 2014; Bisht *et al.*, 2015). En el caso de los metales, estos microorganismos aumentan la disponibilidad y la movilidad del metal en el suelo ya que liberan agentes quelantes, acidifican el suelo y participan en reacciones redox además de proveer a la planta de compuestos para crecer. De igual modo, se ha visto que tienen participación en la biodegradación de contaminantes orgánicos (Jing *et al.*, 2007; McGuinness y Dowling, 2009; Prapagdee *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2005). De hecho, los exudados que la planta libera al medio cambian en presencia de contaminación aparentemente favoreciendo a aquellos que tienen genes para detoxificación (Thijs *et al.*, 2016).

También se pueden combinar con microorganismos como las micorrizas que aumentan la resistencia de la planta al metal (Ogar *et al.*, 2015) y de las cuales se hablará más adelante en este documento.

Hongos micorrízicos arbusculares

Aspectos generales

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) del phylum Glomeromycota, son simbiontes obligados de las raíces que establecen una relación de tipo mutualista con más del 80 % de las plantas terrestres entre las que se encuentra el girasol (*Helianthus annuus*). Los HMA, a cambio de recibir fotosintatos, ejercen un rol clave en el crecimiento (absorción de nutrientes), resistencia y tolerancia a estrés biótico y abiótico (patógenos, salinidad, metales pesados, sequía, etc.) de las plantas causando un cambio sistémico en ellas. También tienen funciones de degradación y participan en la estabilidad del suelo (Khan, 2006; Lingua *et al.*,

2012; Souza, 2015).

Sus estructuras principales son: arbuscúlos, vesículas, hifas y esporas (**Figura 4**). La colonización esta mediada por interacciones genéticas, morfológicas y funcionales entre el hongo y la planta (Souza, 2015).

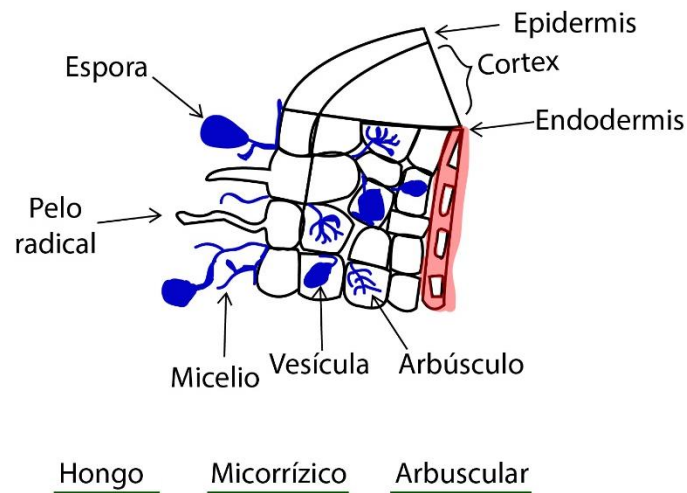


Figura 4. Representación gráfica de las estructuras típicas de un hongo micorrízico arbuscular en simbiosis con una raíz.

Respecto a sus características moleculares, existe una gran variación en la longitud del genoma entre diferentes especies de hongo. Por ejemplo, *Rhizophagus intraradices* tiene un pequeño genoma de 16.54 Mb mientras que especies como *Scutellospora pellucida* y *Racocetra gregaria* tienen genomas de 127.4 Mb y 1058.4 Mb respectivamente (Souza, 2015).

Optimización de la fitorremediación en girasol: hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

Se ha visto que a pesar de que la fitorremediación es un método conveniente para remover metales pesados, la eficiencia sigue siendo baja (Li *et al.*, 2015). Para ayudar a las plantas a acumular una mayor cantidad de metales, es de gran ayuda agregar micorrizas (siendo los hongos micorrízicos arbusculares los más estudiados) (Khan *et al.*, 2000). En un experimento con girasol, inóculado con *Glomus intraradices*, el total de Cd absorbido fue 23% más que en las plantas no micorrizadas, además las plantas eran más grandes (López-Andrade, 2008). Así

mismo, la acumulación de Pb aumento a casi el doble utilizando un consorcio de *Glomus* (*G. intraradices*, *G. albidum*, *G. diaphanum* y *G. claroideum*). Otras especies que colonizan el girasol y son recomendadas para fitorremediación son *Rhizophagus irregularis* y *Funneliformes mosseae* (Hassan *et al.*, 2013).

Factores que determinan la colonización : viabilidad celular

La viabilidad de los propágulos de hongos micorrízicos arbusculares es susceptible a los cambios de temperatura , humedad relativa, al paso del tiempo y a otros factores (Lekberg y Koide, 2008). También puede ser el caso de que esporas viables no germinen por condiciones ambientales o por presentar un estado de dormancia. (Tommerup, 1983; Navarro y González, 1999). Por otro lado, la colonización depende no sólo de la germinación o de la viabilidad del inóculo sino que se deben considerar los nutrientes del suelo, la especie de hongo, la especie de planta y su interacción (Millaleo *et al.*, 2016)

Mecanismos de los HMA para aumentar la tolerancia de la planta a metales pesados.

Existen pocos reportes acerca del mecanismo mediante el cual los hongos micorrízicos arbusculares aumentan la tolerancia a metales pesados en plantas (Hall, 2012). Se sabe que pueden inmovilizar de forma efectiva los metales al unirlos con la pared celular de las hifas y excretando biomoléculas al medio, reduciendo así la cantidad de metal que absorbe la planta. También se sabe que tienen actividades de defensa antioxidante (Emamverdian, 2015); Hildebrandt (2007) comprobó, en micelio extracelular de *Glomus intraradices*, la expresión de genes para transporte de Zinc, una metalotioneína, una proteína de choque térmico y una transferasa de glutatión en presencia de Cd, Cu y Zn (el nivel de expresión varía según el metal). Mientras que la metalotioneína es un quelante, la proteína de choque térmico y la transferasa de glutatión son proteínas asociadas a la mitigación del daño por estrés oxidativo.

Perspectivas de la fitorremediación

El mejoramiento genético vegetal orientado a la optimización de la remediación de ecosistemas contaminados es una realidad actualmente. Especies que incluyen arabidopsis, tabaco (*Nicotiana tabacum*), álamo (*Populus alba*), arroz (*Oriza Sativa*), cacahuete (*Arachis*

hypogaea) e incluso el alga *Chlorella* ya han sido genéticamente transformadas para expresar liasa de organomercurio y/o mercurio reductasa permitiendo a dichas plantas fitorremediar mayores cantidades de mercurio (Ruiz y Daniell, 2010). Se sabe, además, que los ácidos orgánicos, el glutatión y las fitoquelatinas tienen una gran participación en la tolerancia a los metales porque forman complejos con estos (Prasad y Freitas, 2003; Yadav, 2010).

En el futuro, la amplia comprensión de los mecanismos moleculares del consumo, translocación y detoxificación de metales pesados, así como las nuevas técnicas de edición genómica permitirán el desarrollo de nuevas plantas transgénicas más eficientes en la fitoacumulación (Yang *et al.*, 2005; Thangavel *et al.*, 2018) así como de organismos mejorados que optimicen el proceso. Wu *et al.* (2006) utilizaron un gen de *Pseudomonas putida* en rhizobacterium que expresa una fitoquelatina con la cual se lograba un 40% de mayor absorción de Cd cuando hacía simbiosis con *Helianthus annuus*. Existen muchos más ejemplos, como el anterior, de plantas transgénicas con potencial fitorremediador tanto de metales pesados como de contaminantes orgánicos (Delgadillo-López *et al.*, 2011; Jabeen *et al.*, 2009; Van Aken *et al.*, 2010). Otra perspectiva para el futuro será explorar la comunicación, a nivel molecular, entre microbios y plantas de manera que se pueda manipular (Bisht *et al.*, 2015).

Se estudiará también el comportamiento de estos sistemas de biorremediación a nivel de campo y no sólo de laboratorio, tomando en cuenta factores de estrés e interacciones de los organismos modificados con las plantas y microorganismos nativos del ecosistema (Wu *et al.*, 2009).

REFERENCIAS

- Adesodun, J. K., M. O. Atayese, T. A. Agbaje, B. A. Osadiaye, O. F. Mafe y A. A. Soretire (2010)** Phytoremediation potentials of sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for metals in soils contaminated with zinc and lead nitrates *Water Air Soil Pollution* 207: 195-201, doi:10.1007/s11270-009-0128-3.
- Alcalá, J., M. Sosa, M. Moreno, C. Quintana, G. Quintana, S. Miranda y A. Rubio (2008)** Metales pesados en vegetación arbórea como indicador de la calidad ambiental urbana: ciudad de Chihuahua, México. *Multequina* 17:39-54.

- Alvarado, C., N. Dasgupta-Schubert, E. Ambriz, J. Sánchez-Yañez y J. Villegas (2011)** Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 27:357-364.
- Arroyave, C., P. Araque y C. A. Pelaez (2010)** Evaluación de la bioacumulación y toxicidad de cadmio y mercurio en pasto llanero (*Brachiaria dictyoneura*). *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 17: 45-49.
- Baneshi, M. M., R. R. Kalantary, A. J. Jafari, S. Nasseri, N. Jaafarzadeh y A. Esrafilii (2014)** Effect of bioaugmentation to enhance phytoremediation for removal of phenanthrene and pyrene from soil with Sorghum and Onobrychis sativa *Journal of Environmental Health Sciences and Engineering* 12, doi:10.1186/2052-336X-12-24.
- Barcos Arias, M. S., J. J. Peña-Cabriales, A. Alarcón y V. M. Maldonado (2015)** Enhanced Pb absorption by *Hordeum vulgare* L. and *Helianthus annuus* L. Plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi consortium. *International Journal of Phytoremediation* 17:405-413, doi:10.1080/15226514.2014.898023.
- Becerril, J. M., J. I. Barrutia, J. I. García Plazaola, A. Hernández, J. M. Olano y C. Garbisu (2007)** Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas* 16: 50-55.
- Bisht, S., P. Pandey, B. Bhargava y S. Sharma (2015)** Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology *Brazilian Journal of Microbiology* 46:7-21, doi:10.1590/S1517-838246120131354.
- Boyda R. S., M. A. Davis y K. Balkwill (2008)** Elemental patterns in Ni hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ultramafic soil populations of *Senecio coronatus*. *South African Journal of Botany* 74: 158-162, doi:10.1016/j.sajb.2007.08.013.
- Bye, R., E. Linares y D. Lentz (2009)** México: Centro de origen de la domesticación del girasol. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 12: 5-12.
- Cañizares-Villanueva, R. O. (2000)** Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 131-143.
- Carpaena, R. O. y M. P. Bernal (2007)** Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas* 16: 1-3.

- Caselles, J., C. Colliga y P. Zornoza (2002)** Evaluation of trace element pollution from vehicle emissions in petunia plants. *Water Air and Soil Pollution* 136: 1-9, doi:10.1023/A:1015229714374.
- Castro, S., L. C. Davis y L. E. Erickson (2003)** Phytotransformation of benzotriazoles. *International Journal of Phytoremediation* 5: 245-265, doi: 10.1080/713779224.
- Cornejo, P., J. Pérez-Tienda, S. Meier, A. Valderas, F. Borie, C. Azcón-Aguilar y N. Ferrol (2013)** Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 925-928, doi:10.1016/j.soilbio.2012.10.031.
- Davies, T. F., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egilla J. N. y Saraiva G. J. A. (2001)** Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Plant Physiology* 158: 777-786, doi:10.1078/0176-1617-00311.
- Delgadillo-López, A. E., C. A. González-Ramírez, F. Prieto-García, J. R. Villagómez-Ibarra y O. Acevedo-Sandoval (2011)** Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14:597-612.
- Emamverdian, A., Y. Ding, F. Mokhberdorán y Y. Xie (2015)** Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response *The Scientific World Journal* 2015, doi:10.1155/2015/756120.
- Garbisu, C., J. M. Becerril, L. Epelde y I. Alkorta (2007)** Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Ecosistemas* 16: 44-49.
- Gujarathi, N. P., B. J. Haney, H. J. Park, S. R. Wickramaringhe y J. C. Linden (2005)** Hairy roots of *Helianthus annuus*: A model system to study phytoremediation of tetracycline and oxytetracycline. *Biotechnology* 21: 775-780, doi:10.1021/bp0496225.
- Hall J.L. (2002)** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 366:1-11, doi:10.1093/jexbot/53.366.1.
- Hashem, A., E. F. Allah, A. A. Alqarawi y D. Egamberdieva (2016)** Bioremediation of adverse impact of cadmium toxicity on *Cassia italica* Mill by arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 39-47, doi:10.1016/j.sjbs.2015.11.007.

- Hassan, S. E., M. Hijri y M. St-Arnaud (2013)** Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. *New Biotechnology* 30: 780-788, doi: 10.1016/j.nbt.2013.07.002.
- Henson, T. M., W. Cory y M. T. Rutter (2013)** Extensive Variation in Cadmium Tolerance and Accumulation among Populations of *Chamaecrista fasciculata*. *Plos ONE* 8:e63200, doi:10.1371/journal.pone.0063200.
- Hilson, G. (2002)** An overview of land use conflicts in mining communities. *Land Use Policy* 19: 65-73. doi: 10.1016/S0264-8377(01)00043-6.
- Hildebrandt, U., M. Regvar y H. Bothe (2007)** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139-146, doi:10.1016/j.phytochem.2006.09.023.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2010)** Cuentame Minería. <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/secundario/mineria/default.aspx?tema=E> (Enero 2017).
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2015)** Banco de Información Económica. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie/> (Enero 2017).
- Jabeen, R., A. Ahmad y M. Iqbal (2009)** Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms. *The Botanical Review* 75: 339-364, doi:10.1007/s12229-009-9036-x.
- January, M. C., T. Cutright, H. Van Keulen y R. Wei (2008)** Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals? *Chemosphere* 70: 531-537, doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.066.
- Jarup, L. y A. Akesson (2009)** Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238: 201-208, doi:10.1016/j.taap.2009.04.020.
- Jing, Y.-d., Z. He y X. Yang (2007)** Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *University SCIENCE B* 8:192-207, doi:10.1631/jzus.2007.B0192.
- Khalid, S., M. Shahid, N. K. Niazi, B. Murtaza, I. Bibi y C. Dumat (2016)** A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*. doi: 10.1016/j.gexplo.2016.11.021.
- Khan, A. G., C. Kuek, T. M. Chaudhry, C. S. Khoo y W. J. Hayes (2000)** Role of plants, mycorrhizae

- and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41:197-207.
- Khan A. G. (2006)** Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 7:503-514, doi:10.1631/jzus.2006.B0503.
- Kidd, P. S., C. Becerra Castro, M. García Lestón y C. Monterroso (2007)** Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Ecosistemas* 16: 26-43.
- Kozlowski, T.T. (1999)** Soil compaction and growth of woody plants. *Scandinavian Journal of Forest Research* 14: 596-619. doi:10.1080/02827589908540825.
- Lango-Reynoso, F., C. Landeros-Sánchez y M. de R. Castañeda-Chávez (2010)** Bioaccumulation of cadmium (Cd), lead (Pb) and arsenic (As) in *Crassostrea Virginica* (GMELIN, 1791), from Tamiahua lagoon system, Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 26: 201-210.
- López de Andrade, S.A., A. Parada Dias da Silveira, R. Atilío Jorge y M Ferreire de Abreu (2008)** Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza, *International Journal of Phytoremediation* 10:1-13, doi:10.1080/15226510701827002.
- Lara-Viveros, F. M., A. Ventura-Maza, M. Ehsan, A. Rodríguez-Ortega, J. Vargas-Monter y N. Landero-Valenzuela (2015)** Contenido de Cd y Pb en suelo y plantas de diferentes cultivos irrigados con aguas residuales en el valle de Mezquital, hidalgo, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 31:127-132.
- Leewis, M. C., C. M. Reynolds y M. B. Leigh (2013)** Long-term Effects of Nutrient Addition and Phytoremediation on Diesel and Crude Oil Contaminated Soils in subarctic Alaska Cold Regions. *Science and Technology* 96: 129-137, doi:10.1016/j.coldregions.2013.08.011.
- Lekberg Y. y R. T. Koide (2008)** Effect of soil moisture and temperature during fallow on survival of contrasting isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 86: 1117-1124.
- Li, X., Y. Zhou, Y. Yang, S. Yang, X. Sun y Y. Yang (2015)** Physiological and Proteomics Analyses Reveal the Mechanism of *Eichhornia crassipes* Tolerance to High-Concentration Cadmium Stress Compared with *Pistia stratiotes*. *Plos ONE* 10 , doi:10.1371/journal.pone.0124304.

- Lin, J., W. Jiang y D. Liu (2003)** Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Bioresource Technology* 86: 151-155 doi:10.1016/S0960-8524(02)00152-9.
- Lingua, G., E. Bona, V. Todeschini, C. Cattaneo, F. Marsano, G. Berta y M. Cavaletto (2012)** Effects of heavy metals and arbuscular mycorrhiza on the leaf proteome of a selected poplar clone: A time course analysis. *Plos ONE* 6, doi:10.1371/journal.pone.0038662.
- Lone, M. I., Z. I. He, P. J. Stoffella y X. E. Yang (2008)** Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 9:210-220, doi:10.1631/jzus.B0710633.
- Long, X., N. Ni, Z. Liu, Z. Rengel, X. Jiang y H. Shao (2014)** Tissue Fractions of Cadmium in Two Hyperaccumulating Jerusalem Artichoke Genotype. *The Scientific World Journal* 2014, doi:10.1155/2014/421249.
- Marmolejo-Rodríguez, A. J., M. A. Sánchez-Martínez, J. A. Romero-Guadarrama, A. Sánchez-González y V. Magallanes-Ordóñez (2011).** Migration of As, Hg, Pb and Zn in arroyo sediments from a semiarid coastal system influenced by the abandoned gold mining district at El Triunfo, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Environmental Monitoring* 13: 2182-2189, doi:10.1039/c1em10058k.
- Millaleo R., C. Montecinos, R. Rubio, A. Contreras y F. Borie F. (2006)** Efecto de la adición de compost sobre propágulos micorrícicos arbusculares en un suelo volcánico del centro sur de Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 3: 26-39.
- Mirza, N., Q. Mahmood, M. M. Shah, A. Pervez y S. Sultan (2014).** Plants as Useful Vectors to Reduce Environmental Toxic Arsenic Content. *The Scientific World Journal* 2014. doi:10.1155/2014/921581.
- McGuinness, M. y D. Dowling (2009).** Plant-Associated Bacterial Degradation of Toxic Organic Compounds in Soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6: 2226-2247, doi: 10.3390/ijerph6082226.
- Nanda Kumar, P. B. A. (1995).** Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science Technology* 29: 1232-1238, doi:10.1021/es00005a014.
- Nathan, O., K. P. Njeri, O. O. E. Rang'ondi y C. J. Sarima (2012)** The potential of Zea mays,

Commelina bengelensis, Helianthus annuus and Amaranthus hybridus for phytoremediation of waste water. *Ambiente y Agua* 7: 51-60, doi:10.4136/ambiente-y-agua.684.

Nava-Ruíz, C. y M. Méndez-Armenta M (2011) Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias* 16: 140-147.

Navarro-Aviño, J. P., I. Aguilar Alonso y J. R. López-Moya (2007) Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados. *Ecosistemas* 16:10-25.

Navarro M. y Y. González (1999) Identificación del periodo de latencia en tres especies de árboles leguminosos. *Pastos y Forrajes*. 22: 239-243.

Nuñez-Montoya, G. O., M. T. Alarcón-Herrera, A. Melogoza-Castillo, F. A. Rodríguez-Almeida y M. H. Royo-Márquez (2007) Evaluación de tres especies nativas del desierto chihuahuense para uso en fitoremediación. *Tierra Latinoamericana* 25: 35-41.

Ogar, A., L. Sobczyk y K. Turnau (2015) Effect of combined microbes on plant tolerance to Zn-Pb contaminations. *Environment Science and Pollution Research* 22: 19142-19156, doi:/10.1007/s11356-015-5094-2.

Olguín, E. J., M. E. Hernández y G. Sánchez-Galván (2007) Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23:139-154.

Ortiz-Cano, H. G., R. Trejo-Calzada, R. D. Valdez-Cepeda, J. G. Arreola-Ávila, A. Flores-Hernández y B. López-Ariza (2009) Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y micorrizas. *Revista Chapingo serie horticultura* 15: 161-168.

Pena, L. B., M. L. Tomara y S. M. Gallego (2006) Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons. *Electronic Journal of Biotechnology* 9: 258-262, doi:10.2225/vol9-issue3-18.

Peralta-Pérez M. del R. y T. L. Volke-Sepúlveda (2012) La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11: 75-88.

- Popova, L., D. van Dusschoten, K. A. Nagel, F. Fiorani y B. Mazzolai (2016)** Plant root tortuosity: an indicator of root path formation in soil with different composition and density. *Annals of Botany* 118: 685-698. doi: 10.1093/aob/mcw057
- Prasad, M. N. V. y H. M. Freitas (2003)** Metal hyperaccumulation in plants-Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 285-321, doi: 10.2225/vol6-issue3-fulltext-6.
- Prapagdee, B., M. Chanprasert y S. Mongkolsuk (2013)** Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere* 92: 659-666, doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.082
- Puga, S., M. Sosa, T. Lebgue, C. Quintana y A. Campos (2006)** Contaminación por metales pesados en suelos provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada* 5: 149-155.
- Rascio, N. y F. Navari-Izzo (2010)** Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 180:169-181, doi:10.1016/j.plantsci.2010.08.016.
- Razo, I., L. Carrizales, J. Castro, F. Díaz, M. Monroy (2004).** Arsenic and Heavy Metal Pollution of Soil, Water and Sediments in a Semi-Arid Climate Mining Area in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution* 152: 129-152, doi:10.1023/B:WATE.0000015350.14520.c1.
- Ruiz, O. N. y H. Daniell (2010)** Genetic engineering to enhance mercury phytoremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 213-219, doi: 10.1016/j.copbio.2009.02.010.
- Rodríguez-Elizalde, M. D. L. Á., A. Delgado-Alvarado, M. D. C. González-Chávez, R. Carrillo-González, J. M. Mejía-Muñoz y M. Vargas-Hernández (2010)** Emergencia y crecimiento de plantas ornamentales en sustratos contaminados con residuos de mina. *Interciencia* 35: 26-32.
- Romero, F.M., M. A. Armienta y G. González-Hernández (2007)** Solid-phase control on the mobility of potentially toxic elements in an abandoned lead/zinc mine tailings impoundment, Taxco, Mexico. *Applied Geochemistry* 22 :109–127, doi:10.1016/j.apgeochem.2006.07.017.
- Romero, F. M., M. A. Armienta, M. E. Gutiérrez y G. Villaseñor (2008)** Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros.

Revista Internacional de Contaminación 24: 43-54.

Ruiz Huerta, E. A. y M. A. Armienta Hernández (2012) Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 28: 103-117.

Saade Hazin, M. (2013) Desarrollo minero y conflictos socioambientales. *Macroeconomía del desarrollo* 137.

Salt, D. E., M. Blaylock, N. P. Kumar, V. Dushenkov, B. D. Ensley, I. Chet y I. Raskin (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13: 468-474.

Sharma, K., K. P. Sharma y R. Grover (2004) In vitro studies to analyze the response of some ornamental plant species to heavy metals at germination and other stages. *Nature Environment and Pollution Technology* 3: 369-376.

Schützendübel, A. y A. Polle (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53: 1351-1365.

Shahandeh, H. y L. R. Hossner (2002) Role of soil properties in phytoaccumulation of uranium. *Water Air Soil Pollution* 141:165-180, doi:10.1023/A:1021346828490.

Shanker, A. K., C. Cervantes, H. Loza-Tavera y S. Avudainayagam (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31: 739-753, doi:10.1016/j.envint.2005.02.003.

Shaw, J. (1990) *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects* (C. Press Ed.). New York, <https://www.crcpress.com/Heavy-Metal-Tolerance-in-Plants-Evolutionary-Aspects/Shaw/p/book/9780849368523>

Sommer, I., P. Fernández, H. Rivas y M. E. Gutiérrez (2000) La geostatística como herramienta en estudios de contaminación de suelos. Análisis de caso: afectación por arsénico, plomo y cadmio contenidos en jales mineros. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 16:205-214.

Sood, A., P. L. Uniyal, R. Prasanna y A. S. Ahluwalia (2012) Phytoremediation Potential of Aquatic Macrophyte, *Azolla*. *AMBIO* 41: 122-137, doi:10.1007/s13280-011-0159-z

Souza T. (2015) Handbook of arbuscular mycorrhizal fungi. Springer. Coimbra, Portugal. 378 p.

doi:10.1007/978-3-319-24850-9.

Thangavel, P., S. Ganapathi, V. Palanisamy y Guvvala S. R. (2018). Bio-Geotechnologies for mine site rehabilitation. Chapter 5- Plant Molecular Approaches for successful implementation of mine site rehabilitation. *Elsevier* 82-102, doi:10.1016/B978-0-12-812986-9.00005-1.

Tommerup C. (1983) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 81(1): 37-45.

Thijs, S., W. Sillen, F. Rineau, N. Weyens y J. Vangronsveld (2016) Towards an Enhanced Understanding of Plant-Microbiome Interactions to Improve Phytoremediation: Engineering the Metaorganism. *Frontiers in Microbiology* 7, doi:10.3389/fmicb.2016.00341.

Unger, P.W. y T.C. Kaspar (1993) Soil compaction and root growth: a review. *Agronomy Journal* 86: 759-766. doi:10.2134/agronj1994.00021962008600050004x.

Vahter, M., M. Berglund, A. Akesson y C. Lidén (2002) Metals and women's health. *Environmental Research Section* 88:145-155, doi:10.1006/enrs.2002.4338.

Van Aken, B., P. A. Correa y J. L. Schnoor (2010) Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyls: New Trends and Promises *Environmental Science Technology*, 44(8), 2767-2776, doi:10.1021/es902514d.

WHO, World Health Organization (2010).
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/> (Enero 2017)

WHO, World Health Organization (2016).
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/> (Enero 2017)

Wu, C. H., S. M. Bernard, G. L. Andersen y W. Chen (2009) Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial Biotechnology* 2:428-440, doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00109.x.

Wu, C. H., T. K. Wood, A. Mulchandani y W. Chen (2006) Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1129-1134, doi:10.1128/AEM.72.2.1129-1134.2006.

- Xiao, X., T. Chen, Z. An, M. Lei, Z. Huang, X. Liao y Y. Liu (2008)** Potential of *Pteris vittata* L. for phytoremediation of sites co-contaminated with cadmium and arsenic: The tolerance and accumulation. *Journal of Environmental Sciences* 20:62-67, doi:10.1016/S1001-0742(08)60009-1.
- Xie, Q., Z. Li, L. Yang, J. Lv, T. O. Jobe y Q. Wang (2015)** A newly identified passive hyperaccumulator *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* under manganese stress. *Plos ONE*, 10, doi: 10.1371/journal.pone.0136606.
- Xiu-Zhen, H., Z. Dong-Mei, L. Dan-Dan y J. Ping (2012)** Growth, cadmium and zinc accumulation of ornamental sunflower (*Helianthus annuus* L.) in contaminated soil with different amendments. *Pedosphere* 22: 631-639, doi:10.1016/S1002-0160(12)60048-4.
- Yadav, S. K. (2010)** Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76:167-179, doi:10.1016/j.sajb.2009.10.007.
- Yang, X. E., Y. Feng, Z. I. He y P. J. Stoffella (2005)** Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18:339-353, doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.007.
- Zarazúa, G., S. Tejada, P. Ávila-Pérez, L. Carapia, C. Carreño y M. Balcázar (2011)** Metal content and elemental composition of particles in cohesive sediments of the Lerma river, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 27:181-190.

HIPÓTESIS

- La inoculación con hongos micorrízicos arbusculares incrementa la capacidad para acumular Pb y Zn en accesiones ornamentales de *Helianthus* spp.
- Las accesiones silvestres de *Helianthus* spp tienen mayor capacidad para acumular Pb y Zn que las variedades ornamentales cultivadas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad fitoextractora de distintas accesiones ornamentales de *Helianthus* spp, tanto silvestres como cultivadas, asociadas con hongos micorrízicos arbusculares como alternativa para la remediación de un jal minero contaminado con metales pesados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Seleccionar el mejor inóculo de hongo micorrízico arbuscular para promover el crecimiento de *Helianthus* spp.
- 2) Seleccionar la accesión de *Helianthus* spp que, inoculada con la micorriza seleccionada, tenga mayor capacidad de remediación de suelos contaminados con metales pesados.

CAPÍTULO II

Efecto de la composición del sustrato sobre el crecimiento del girasol ornamental (Var. Doble Enana)

Ornamental sunflower (Var. Doble Enana) in different substrates in flowerpot in field

Vital-Vilchis I.¹; Quiñones-Aguilar E.E.¹; Hernández-Montiel L.G.²; Murillo-Amador B.²; Rincón-Enríquez G.^{1*}

¹Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México, C.P. 45019. Tel. (33) 33455200. ²Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, BCS, México, C.P. 23096.

*Autor para correspondencia (grincon@ciatej.mx)

RESUMEN

Objetivo: Determinar un sustrato para el cultivo de girasol ornamental Var. Doble Enana en macetas en condiciones de campo.

Diseño/metodología/aproximación: Se realizó un experimento completamente al azar con cinco tratamientos de una mezcla (suelo, arena, agrolita: 60:35:5) en distintas proporciones y en combinación con un componente orgánico (Peat Moss). En una maceta se colocó una planta de girasol, la cual fue colocada en condiciones de campo durante la época de lluvias durante 8 semanas. Se evaluó la altura de planta (AP), diámetro de tallo (DT) y acumulación de materia seca (PST), los datos fueron analizados mediante una prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

Resultados: Los resultados indicaron que el sustrato de la mezcla:Peat Moss (50-50) promovieron significativamente (Tukey, $P \leq 0.05$) mayor el crecimiento del girasol ornamental contenido en maceta en condiciones de campo abierto (AP=27.4 cm; DT=8.7 mm; PST=10.5 g).

Limitaciones del estudio/implicaciones: Los sustratos con alto contenido de suelo y arena limitan significativamente el crecimiento vegetal del girasol ornamental en maceta a cielo abierto.

Hallazgos/conclusiones: Un sustrato rico en componentes orgánicos es importante para un óptimo crecimiento de plantas de girasol ornamental (Var. Doble Enana).

Palabras clave: sustrato, aireación, musgo, crecimiento de girasol.

SUMMARY

Objective: Determine a substrate for the cultivation of ornamental sunflower Var. Doble Enana in pots in field conditions.

Design/methodology/approach: A completely randomized experiment was carried out with five treatments of a mixture (soil, sand, agrolite: 60: 35: 5) in different proportions and in combination with an organic component (Peat Moss). In a pot a sunflower plant was placed, which was placed under field conditions during the rainy season for 8 weeks. The plant height (PH), stem diameter (ST) and dry matter accumulation (DM) were evaluated, the data were analyzed by means of a Tukey test ($P \leq 0.05$).

Results: The results indicated that the substrate of the mixture: Peat Moss (50-50) promoted the growth significantly (Tukey, $P \leq 0.05$) of the ornamental sunflower contained in pot in open field conditions (PH= 27.4 cm, ST= 8.7 mm, DM= 10.5 g).

Limitations on study/implications: Substrates with a high content of soil and sand significantly limit the growth of the ornamental sunflower in a pot in the open field.

Findings/conclusions: A substrate rich in organic components is important for optimal growth of ornamental sunflower plants (Var. Doble Enana).

Keywords: Substrate, aeration, moss, sunflower growth.

INTRODUCCIÓN

Helianthus annuus L., comúnmente llamada girasol, pertenece a la familia de las Asteraceae. El análisis de documentos históricos y semillas descubiertas en Tabasco y Morelos,

indican que los girasoles cultivados fueron importantes durante la época prehispánica y del virreinato en el centro de México. A pesar de que las plantas silvestres son genéticamente distantes de los cultivares comerciales contemporáneos, las evidencias indican a México como el centro de origen y domesticación de la especie (Bye *et al.*, 2009).

Las variedades de girasol pueden emplearse como: 1) fuente de semillas comestibles o para obtención de aceite; 2) para fines ornamentales (Bye *et al.*, 2009; Uhdre *et al.*, 2017).

El girasol ornamental en la actualidad, en la floricultura mexicana, tiene cada vez una mayor relevancia; sin embargo, la tecnología agronómica para su producción está readaptándose del cultivo oleaginoso, en este contexto, es importante indicar que el componente suelo es esencial para la óptima producción de flores, en este sentido la característica física de la compactación del suelo puede beneficiar o inhibir el crecimiento vegetal.

Los suelos altamente compactados alteran la estructura del suelo y la hidrología al aumentar la densidad de este y bajar su porosidad (Kozlowski, 1999; Popova *et al.*, 2016). La compactación causa problemas fisiológicos en las plantas ya que afecta el crecimiento de las raíces y en consecuencia la absorción de agua y nutrientes (Unger y Kaspar, 1993). También se ha visto que altera el nivel de fitohormonas, aumentando la cantidad de etileno y ácido abscísico (Kozlowski, 1999; Zhang *et al.*, 2018). Cabe mencionar que el ácido abscísico y el etileno son hormonas que se sobre expresan en respuesta a estrés hídrico y a otros tipos de estrés (Page, 2006; Solís-Guzmán *et al.*, 2017).

La fotosíntesis decrece porque las hojas son de menor tamaño y por acción hormonal. Así mismo, la compactación, inhibe la germinación de las semillas (Kozlowski, 1999). Un sustrato es cualquier material sólido que se utiliza para producir plantas o cultivos en contenedores o macetas; entre sus principales funciones es de soporte, aireación y retención de agua; el sustrato puede o no intervenir en el proceso de nutrición mineral de las plantas (ACCIMIN, 2018). Ejemplos de sustratos son la perlita, la vermiculita, el Peat Moss, la arena y el propio suelo.

La perlita marca Agrolita es una roca volcánica vítrea; el mineral se tritura y se calienta a altas temperaturas para expandir las partículas; lo cual constituye un sustrato inerte en combinación con suelo permite incrementar los espacios porosos para aumentar la circulación del aire y del agua; lo cual también contribuye a que se extiendan las raíces (ACCIMIN, 2018). Por

lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de distintos sustratos sobre el crecimiento de girasol ornamental (Var. Doble Enana) en macetas en condiciones de campo durante la época de lluvias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la variedad girasol ornamental Doble Enana (Vita®). Las semillas se germinaron con la técnica “tacos de germinación” durante 5 días en condiciones de oscuridad a 25°C. Las plántulas germinadas de aproximadamente 6 cm de longitud y con sólo sus cotiledones se trasplantaron en macetas de plástico con capacidad de 3 litros. En cada maceta se colocaron 1.5 kg de sustrato estéril (120°C, 1.05 kg cm⁻², 6 h). Los sustratos utilizados fueron suelo agrícola, arena, Agrolita® y Peat Moss (turba) (Sunshine® Mix No. 3).

Se realizó un experimento con arreglo completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Este experimento fue establecido el 15 de mayo y conducido durante 8 semanas en condiciones de campo en las instalaciones del CIATEJ Unidad Zapopan 20° 70'16.59" N y 103°47'46.32" O.

Se evaluaron 5 tratamientos: 1) suelo: arena: agrolita (60:35:5), 2) suelo: arena: agrolita (42:25:33), 3) suelo: arena: agrolita (30:18:52), 4) suelo: arena: agrolita: turba (30:18:2:50) y 5) turba 100%. La unidad experimental (UE) fue una maceta con una planta de girasol ornamental; las UE fueron regadas a capacidad de campo hasta el inicio de las lluvias; a las dos semanas después del trasplante fueron fertilizadas con 0.3 g de nitrógeno por maceta.

A las 8 semanas después de establecido el experimento se evaluaron variables de crecimiento vegetal: altura de la planta (cm), medida desde la base hasta el ápice de la planta sin tomar en cuenta el capítulo floral con un flexómetro (Truper®). Diámetro del tallo (mm): medido con un Vernier electrónico (Surtek®) en la base del tallo. Número de hojas: se contaron las hojas completamente desarrolladas. Diámetro del capítulo floral (cm): se midió de extremo a extremo del capítulo con un flexómetro (Truper®); en caso de que el capítulo fuera ovalado se tomó en cuenta el diámetro más pequeño. Peso seco de tallo-hojas, raíz y capítulo floral (g): cada órgano vegetal fue colocado en bolsas de papel por tratamiento y se colocaron en una estufa de secado a 65°C hasta peso constate, el peso fue determinado con una balanza digital (2 decimales); en

caso de plantas con más de un capítulo, se procedió de la siguiente manera: para capítulo floral se consideró el apical, los laterales fueron incluidos en el peso del tallo-hojas.

Los datos registrados de cada variable de respuesta fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía ($P \leq 0.05$) y cuando se encontraron diferencias significativas se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias Tukey ($P \leq 0.05$); ambos análisis fueron realizados empleando el programa Statgraphics Centurion (StatPoint Inc., 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el **Cuadro 6**, **Figuras 5**, **6** y **7** se presentan los análisis de las distintas variables del crecimiento vegetal del girasol ornamental (Var. Doble Enana) en respuesta a los diferentes sustratos en los cuales fueron colocadas las plantas. Como se puede apreciar el tratamiento (suelo:arena:agrolita:turba (30:18:2:50)) mostró diferencias significativamente superiores en todas las variables de respuesta. Esto revela un efecto positivo del sustrato rico en componentes orgánicos sobre las plantas de girasol, sin embargo, componentes orgánicos al 100% no le favorece en su desarrollo como se observa en el **Cuadro 6** y **Figuras 5**, **6** y **7**. Un aspecto a resaltar del tratamiento mezcla: (suelo:arena:agrolita:turba (30:18:2:50)) es que en el peso seco de raíz (**Figura 5**), se nota un incremento significativo respecto a todos los tratamientos, esto puede ser efecto de que el sustrato (**Figura 6**) proporcionó las condiciones de porosidad, permitiendo a la planta tener un óptimo medio que le proporcionaran nutrientes y agua como lo sugieren Unger y Kaspar (1993). A nivel de nutrición solo se aportó N_2 y en una muy baja concentración, por lo cual, los nutrientes contenidos en el sustrato (distintas mezclas, incluso en el Peat Moss) pudieron ser tomados por la planta gracias al mejoramiento de las propiedades físicas de las distintas mezclas como lo indicado por Unger y Kaspar (1993).

Cuadro 6. Crecimiento de girasol ornamental (Var. Doble Enana) en distintos sustratos en maceta bajo condiciones de campo abierto a las 8 semanas después de establecido el experimento.

Sustrato	Descripción del tratamiento		Variables de crecimiento			
	Composición del sustrato	Proporciones (% v/v)	Altura de planta (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Diámetro de capitulo (cm)	Número de hojas
1	Suelo: arena: agrolita	60:35:5	6.8 bc	2.3 b	1.1 b	4.3 bc
2	Suelo: arena: agrolita	42:25:33	6.4 bc	2.0 b	1.3 b	3.0 bc
3	Suelo: arena: agrolita	30:18:52	4.0 c	1.3 b	1.9 b	1.8 c
4	Suelo:arena:agrolita: turba	30:18:2:50	27.4 ab	8.7 a	8.8 a	11.7 a
5	Turba	100	34.0 a	6.9 a	7.5 a	9.8 ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

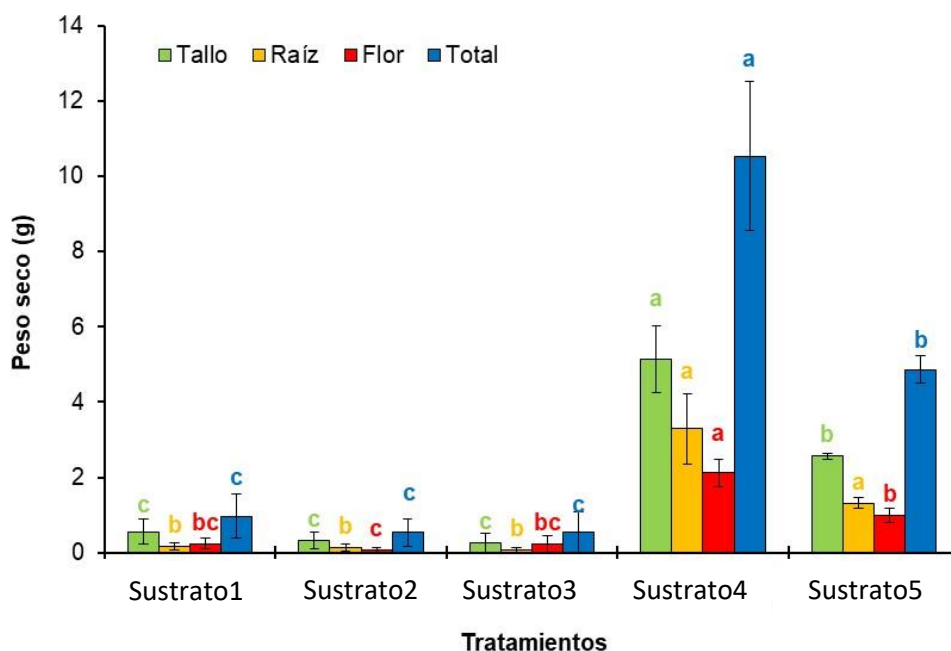


Figura 5. Acumulación de peso seco de plantas de girasol ornamental (Var. Doble Enana) en distintos sustratos en maceta bajo condiciones de campo abierto a las 8 semanas después de establecido el experimento. Letras distintas en el mismo tipo de rectángulo y color indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); las barras en cada rectángulo indican el error estándar.

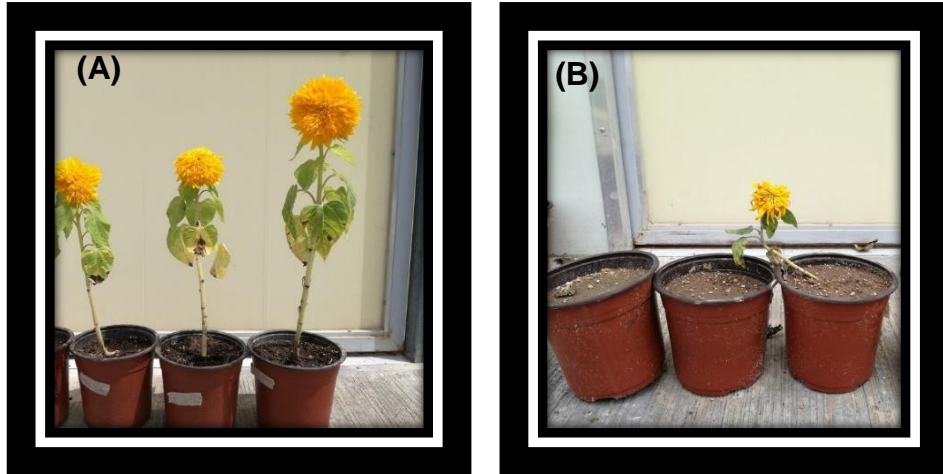














Figura 6. Crecimiento vegetal y floral de girasoles variedad Doble Enana. (A) Sustrato 4 (Suelo: arena: agrolita: turba (30:18:2:50)), (B) Sustrato 3 (Suelo: arena: agrolita (30:18:52))

Sustrato (proporción %)	Cronología (semanas)			
	2	4	6	8
1				
2				
3				

4



5



Figura 7. Comportamiento del crecimiento del girasol ornamental (Var. Doble Enano) en diferentes sustratos en maceta en condiciones a cielo abierto en la época de lluvias en instalaciones de CIATEJ en la Unidad Zapopan.

La mezcla Sunshine contiene musgo *Sphagnum* (Peat Moss), vermiculita, carbonatos para ajustar el pH, un agente humectante y una formulación base de fertilizantes lo que permite una óptima retención del agua aplicada y una buena aireación (Grc Agroindustrial, 2018). Esto proporciona al sustrato al cual se combina una consistencia suave y porosa, mientras que los sustratos sin Peat Moss se endurecen rápidamente estresando a la planta (**Figura 8**).

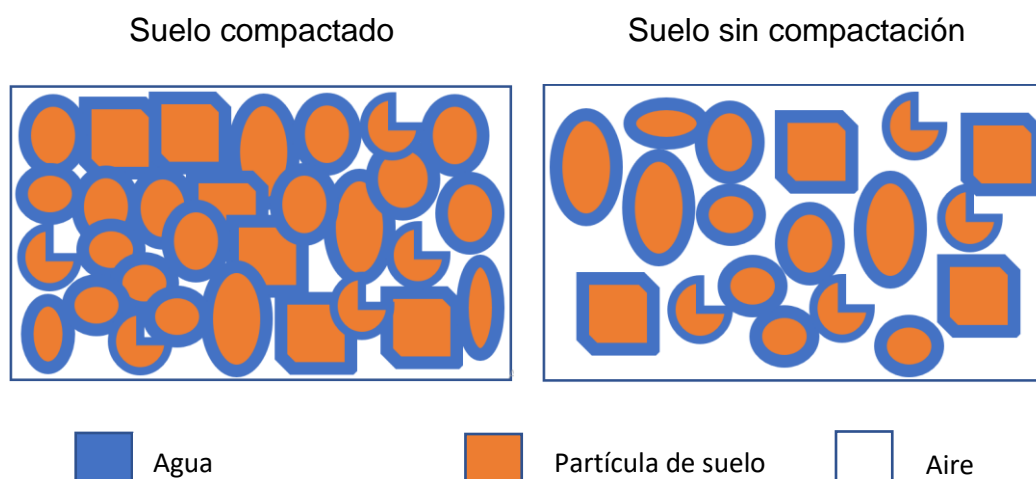


Figura 8. Representación esquemática de un suelo con y sin compactación. El suelo no compactado permite la aireación, la circulación de agua y nutrientes, además tiene espacio para la expansión de las raíces. (Heilman, 1981).

El girasol ornamental (Var. Doble Enana) es una planta susceptible a la compactación del suelo; en parte los resultados del crecimiento de la Doble Enana respaldan este aspecto. Posiblemente otras variedades de girasol ornamental también sean susceptibles a la compactación.

CONCLUSIONES

El sustrato mezcla: Peat Moss (50-50) proporcionó las condiciones físicoquímicas más apropiadas para el crecimiento óptimo de girasol ornamental (Var. Doble Enana) en macetas en condiciones de campo durante la temporada de lluvias.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por proyectos del Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ y mediante el proyecto 293362 del CONACYT a través del Laboratorio Nacional PLANTECC. IVV agradece a CONACyT por la beca de estudios de maestría. La Dra. E. E. Quiñones-Aguilar participó como codirectora de este trabajo de tesis de maestría.

REFERENCIAS

- ACCIMIN, 2018.** Agrolita. Fecha de consulta: 16 de abril (2018). Obtenido de:
<http://www.dicamex.com.mx/index.html>
- Bye, R., E. Linares, y D. Lentz (2009)** México: centro de origen de la domesticación del girasol. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 12: 5-12.
- Grc Agroindustrial (2018)** Sunshine mix 3. Fecha de consulta: 16 de abril 2018. Obtenido de:
http://www.grcagroindustrial.com/grc/index.php?categoryid=8&p2_articleid=2
- Heilman P. (1981)** Root penetration of Douglas- fir seedlings into compacted soil. *Forest Science* 27 (4): 660-666. doi:10.1093/forestscience/27.4.660.
- Kozlowski, T.T. (1999)** Soil compaction and growth of woody plants. *Scandinavian Journal of Forest Research* 14: 596-619. doi:10.1080/02827589908540825.
- Page, W.M. (2006)** Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum* 100: 620-630. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb03068.x.
- Popova, L., D. van Dusschoten, K. A. Nagel, F. Fiorani y B. Mazzolai (2016)** Plant root tortuosity: an indicator of root path formation in soil with different composition and density. *Annals of Botany* 118: 685-698. doi: 10.1093/aob/mcw057.
- Solís-Guzmán, M.G., G. Argüello-Astorga, J. López-Bucio, L. F. Ruiz-Herrera, J. E. López-Meza, L. Sánchez-Calderón, Y. Carreón-Abud y M. Martínez-Trujillo (2017)** *Arabidopsis thaliana* sucrose phosphate synthase (sps) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic

stress. *Gene Expression Patterns* 25: 92-101. doi: 10.1016/j.gep.2017.06.001.

StatPoint, Inc. (2005) StatGraphics Centurion XV version 15.02.06. Warrenton, Virginia, USA. Obtenido de: www.statgraphics.com

Uhdre, R.S., A.R. Manningel, A.E.A. Ecker, M. Sorace, J. H. Castaldo y A. Nolla (2017) Cultivation of *Helianthus annuus* L. cv. Sunflower Sunspot Dwarf with silicon application. *Scientific Electronic Archives* 10: 64-67.

Unger, P.W. y T.C. Kaspar (1993) Soil compaction and root growth: a review. *Agronomy Journal* 86: 759-766. doi:10.2134/agronj1994.00021962008600050004x.

Zhang, D.J., Y.J. Yang, C.Y. Liu, F. Zhang y Q.S. Wu (2018) Root hair growth and development in response to nutrients and phytohormones. En: Root biology. Giri B., Prasad R., Varma A. (eds). *Soil Biology* 52: 65-84. doi: 10.1007/978-3-319-75910-4_3.

CAPÍTULO III

Crecimiento de girasol ornamental en maceta a cielo abierto por efecto de hongos micorrízicos arbusculares

Ornamental sunflower growth on flower pot in open sky as effect of arbuscular mycorrhizal fungi colonization

Vital-Vilchis I.¹; Quiñones-Aguilar E.E.¹; Hernandez-Cuevas L.V.²; Rincón-Enríquez G.^{1*}

¹Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México, C.P. 45019. Tel. (33) 33455200. ²Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

*Autor para correspondencia (grincon@ciatej.m)

RESUMEN

La popularidad del girasol como planta ornamental se incrementó dramáticamente en la última década. Algunos estudios muestran que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) aumentaron el diámetro del capítulo floral y un adelanto en la floración de gerbera; sin embargo, esto depende tanto de la especie de HMA, como de la planta hospedera. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes inóculos de HMA en el crecimiento de variedades ornamentales de girasol. Se estableció un experimento en bloques al azar con 6 repeticiones por tratamiento con dos factores: HMA con cinco niveles: *Rhizophagus intraradices* (Ri), *Funneliformis mosseae* (Fm), consorcios: Cerro del Metate (CM) y Las Campesinas (LC) y sin HMA; variedad de girasol ornamental con cuatro niveles: Belleza de Otoño (BO), Gigante Simple Amarillo (GSA), Doble Enana (DE) y Doble Gigante (DG). Setenta días después de establecido el experimento se evaluaron variables de crecimiento y colonización micorrízica. Los resultados mostraron que GSA-CM fue

superior en variables de crecimiento respecto a los otros tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). El consorcio CM estimuló el crecimiento de GSA con respecto al girasol no inoculado en un 31%. Sin embargo, la variedad BO mostró 60% de decremento del crecimiento con todos los inóculos de HMA respecto al control sin HMA. Con el inóculo Fm, se tuvo la menor colonización micorrízica (28%); sin embargo, mostró efectos significativos en el crecimiento del girasol. Estos resultados sugieren una diversidad de respuesta al crecimiento dependiendo de la variedad de girasol y el tipo de HMA.

Palabras clave: *Helianthus annuus*, micorrizas, floricultura.

SUMMARY

Sunflower popularity as an ornamental plant has increased dramatically in the last decade. The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increased the diameter of the floral chapter and early flowering in the gerbera; however, this effect depends on the inoculum species of AMF and the host plant. The aim of this study was to assess the effect of different AMF inoculums on plant growth of different sunflower ornamental varieties. A two factors random block experiment with 6 replicates in Zapopan at 2017 was established; AMF with five levels: *Rhizophagus intraradices* (Ri), *Funneliformis mosseae* (Fm), consortium Cerro del Metate (CM), Las Campesinas (LC) and without AMF; ornamental sunflower variety with four levels: Belleza de Otoño (BO), Gigante Simple Amarillo (GSA), Doble Enana (DE) and Doble Gigante (DG). Seventy days after having established the experiment, growth variables and mycorrhizal colonization percentage were measured. Results showed that GSA-CM was superior in plant growth to other treatments (Tukey, $P \leq 0.05$). The consortium CM of AMF stimulated GSA growth in comparison with respect to the non-inoculated by 31%. Nevertheless, the variety BO showed 60% growth decrement whenever inoculated with AMF in comparison with the control without AMF. Fm inoculum had the lowest mycorrhizal colonization percentage (28%), despite of this, it showed significant effects over ornamental sunflower varieties growth. These results suggest the wide diversity of responses, in terms of growth, depending on the variety of sunflower and the type of AMF.

Index words: *Helianthus annuus*, micorrizas, floricultura.

INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) del phylum Glomeromycota, son simbiontes obligados que establecen una relación de tipo mutualista con más del 80% de las plantas terrestres entre las que se encuentra el girasol (*Helianthus annuus*) (Barcos *et al.*, 2015). Los HMA, a cambio de recibir fotosintatos, ejercen un rol clave en el crecimiento de las plantas, así como resistencia y tolerancia a estrés de tipo biótico y abiótico. Las plantas son protegidas contra patógenos, salinidad, metales pesados y sequía, entre otros, al causar los HMA un cambio sistémico en ellas; aunque también participan en la estabilidad del suelo (Khan, 2006; Lingua *et al.*, 2012; Souza, 2015).

Además, se ha comprobado que las micorrizas son un factor importante que contribuye al mantenimiento de la biodiversidad vegetal de un ecosistema (Van Der Heijden *et al.*, 1998), ya que existen plantas que dependen de la micorrización para sobrevivir (Wilson y Hartnett, 1997). La estimulación en el crecimiento de las plantas por efecto de la micorrización se ha comprobado en diversas especies vegetales de importancia agrícola como por ejemplo el tomate (Ley-Rivas *et al.*, 2015), la papaya (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2012), el café (Parra *et al.*, 1990), el maíz (Bi *et al.*, 2018), el frijol (Liriano *et al.*, 2012) y en el árbol *Heliocarpus popayanensis* L usado para reforestación (Zangaro *et al.*, 2015).

El girasol (*H. annuus*) pertenece a la familia Asteraceae, tiene su origen y centro de biodiversidad en México. El girasol ha sido tradicionalmente usado como planta oleaginosa, sin embargo, en la última década su popularidad como cultivo ornamental ha incrementado significativamente. La atractiva apariencia del capítulo floral en el girasol ha estimulado su uso como planta de jardín, maceta y como flor de corte (Bye *et al.*, 2009; Yañez *et al.*, 2004).

Distintos estudios muestran que la micorrización aumenta el tamaño de algunas plantas ornamentales como anturio (*Anthurium andreanum* Lind) (Corbera *et al.*, 2008) y gerbera (*Gerbera jamesonii* cv. Bolus), donde la micorrización aumentó un 27% el diámetro del capítulo floral y adelantó la floración 50 días (Soroa *et al.*, 2003). Esto hace de los HMA, una herramienta importante para la floricultura.

En girasol, se ha comprobado que plantas micorrizadas con *Funneliformis mosseae* muestran mayor acumulación de biomasa, así como nitrógeno y rendimiento de semillas en condiciones de sequía (Gholamhoseini, 2013). Los HMA influyen en la absorción de fósforo de manera positiva cuando éste no está accesible en el suelo. De hecho, se recomienda el uso de HMA para reducir la fertilización de fósforo inorgánico en plantas (Chandrashekara *et al.*, 1995; Soleimanzadeh, 2010; Quiñones-Aguilar *et al.*, 2012).

Algunas de las especies de HMA que colonizan a girasol son: *Funneliformes mosseae* (Hassan *et al.*, 2013), diferentes especies de *Glomus*: *G. intraradices*, *G. albidum*, *G. diaphanum* y *G. claroideum* (Davies *et al.*, 2001; Barcos *et al.*, 2015) y *Rhizoglosum irregularis* (Vangelisti *et al.*, 2017). Algunas especies de HMA muestran mayor efecto benéfico que otras (Gholamhoseini, 2013) ya que los HMA pueden presentar diferentes grados de compatibilidad con su hospedero (Van der Heijden *et al.*, 1998). Los HMA se benefician en forma diferente según la planta hospedera y estas responden de manera diferencial según la especie que se utilice (Ley-Rivas *et al.*, 2015). No es sorprendente que la identidad de la planta y su abundancia este correlacionado con la composición y diversidad de los hongos micorrízicos del suelo (Martínez-García *et al.*, 2015).

Además, en algunos casos se ha observado que el uso de consorcios micorrízicos favorece más el crecimiento vegetal que el uso de inóculos con monoespecies (Mehrotra y Bajjal, 1995). Al respecto, Trejo *et al.* (2011) observaron crecimiento significativamente mayor en plantas de café con un consorcio que contuvo mayor número de especies de HMA que con otro consorcio con menor cantidad.

Bajo este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (consorcios y monoespecies) en el crecimiento vegetal de variedades ornamentales de girasol cultivado en maceta a cielo abierto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Variedades de girasol ornamental e inóculos de HMA

Se emplearon cuatro variedades de girasol ornamental: Belleza de Otoño (BO),

Doble Gigante (DG), Doble Enana (DE) y Girasol Simple Amarillo (GSA) de la compañía Vita®. Las semillas fueron lavadas con hipoclorito de sodio (5%) durante 5 min y posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada tres veces. Posteriormente, las semillas fueron colocadas en papel absorbente humedecido con agua corriente a través de la técnica “tacos de germinación” (Moreno, 1996). Estos tacos permanecieron en condiciones de oscuridad a 25 °C por cinco días. Posteriormente se procedió al trasplante de las plántulas a maceta, seleccionando aquellas con aproximadamente 6 cm de altura. Los inóculos de HMA empleados fueron: *Rhizophagus intraradices* (Ri), *Funneliformis mosseae* (Fm) y los consorcios nativos de rizosfera de agave: Cerro del Metate (CM) y Las Campesina (LC) descritos por Trinidad *et al.* (2017). Estos inóculos fueron previamente propagados durante ocho meses bajo invernadero en macetas trampa empleando sorgo (*Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanese* Sweet Chow; Western Seed Co.) como hospedero.

Las variedades de girasol fueron inoculadas con 100 esporas de HMA al momento del trasplante colocadas directamente sobre la raíz. El sustrato empleado en el experimento fue (suelo: arena: agrolita: turba (30:18:2:50)). El sustrato fue esterilizado en autoclave (120 °C, 1.05 kg cm⁻², 6 h). Se emplearon bolsas de polietileno negro con capacidad de 5 kg como macetas para una planta de girasol, en cada bolsa se colocaron 3 kg de la mezcla esterilizada.

Condiciones ambientales durante la experimentación

El experimento se realizó a la intemperie, en las instalaciones del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), sede Zapopan 20° 42' 5.97"N, 03° 28' 25.83"O; en la época de lluvias de 2017 (14 de junio al 23 de agosto). La temperatura promedio fue 20.3 °C con una máxima promedio de 31 °C y mínima de 15.5 °C. Durante el experimento se registró una precipitación pluvial acumulada de 279.1 mm; una velocidad promedio del viento de 2.1 km h⁻¹ (IAM-CUCEI, 2017).

Ensayo de evaluación de los HMA en el crecimiento de girasol ornamental

Se utilizó un diseño experimental en bloques al azar de factores fijos bajo un arreglo bifactorial 5×4 y seis repeticiones por tratamiento. El bloqueo eliminó el factor de

radiación solar. La unidad experimental fue una maceta con una planta de girasol. Los cinco niveles del factor HMA fueron: *Rhizophagus intraradices* (Ri), *Funneliformis mosseae* (Fm), Cerro del metate (CM), Las Campesinas (LC), sin HMA (control). Los cuatro niveles del factor girasol ornamental fueron: Belleza de Otoño (BO), Gigante Simple Amarillo (GSA), Doble Enana (DE), Doble Gigante (DG). En cada unidad experimental se cuantificó al final del experimento (70 días después del trasplante): altura de planta, diámetro del tallo, número de hojas, diámetro de capítulo floral, peso seco de raíz, tallo con hojas, capítulo floral y colonización micorrízica. Para la colonización micorrízica se siguió la técnica de clareo y tinción de Phillips y Hayman (1970); para la cuantificación se empleó el método propuesto por Hernández-Cuevas *et al.* (2012) que consiste en tomar 90 raíces teñidas de 2 cm de longitud, se colocan 30 por portaobjeto y se observan al microscopio compuesto (40X) las estructuras de la simbiosis micorrízica, la estimación del porcentaje de colonización micorrízica (PCM) fue mediante la fórmula siguiente: $PCM = \left[\frac{\text{Número de campos colonizados}}{\text{Número total de campos observados}} \times 100 \right]$. Los datos obtenidos de la evaluación de las distintas variables de respuesta fueron sometidos a un análisis de varianza y a una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Los datos de peso seco fueron transformados con logaritmo natural; para el peso seco y colonización micorrízica se realizó un análisis de correlación de Pearson; estos análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statgraphics Centurion (StatPoint Inc., 2005).

RESULTADOS

El crecimiento de girasol en asociación con HMA depende de la variedad vegetal

De manera general, 70 días después de establecido el experimento, las plantas de la variedad Gigante Simple Amarillo (GSA) tanto las inoculadas como las no inoculadas con HMA presentaron un crecimiento mayor a las demás variedades. El tratamiento girasol-GSA inoculado con Cerro del Metate (CM) presentó significativamente el mayor crecimiento vegetal ($P \leq 0.05$) en comparación con la variedad GSA sin HMA. El inóculo CM promovió el crecimiento vegetal de la variedad GSA en la mayoría de las variables de

respuesta excepto altura y número de hojas ($P \leq 0.05$) (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Crecimiento de variedades de girasol ornamental (acumulación de biomasa) inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) a los 70 días después del trasplante (época de lluvias 2017, Zapopan Jalisco).

Tratamiento	Peso seco (g)			
	Tallo	Raíz	capítulo	Total
GSA RI	9.45 cdef	6.12 cdef	7.00 de	22.97 def
GSA FM	16.71 ef	8.76 def	9.76 e	36.21 ef
GSA CM	18.45 f	13.24 f	10.31 e	42.12 f
GSA LC	10.27 cdef	4.51 bcdef	3.51 bcde	16.76 bcdef
GSA sin HMA	14.90 ef	9.72 ef	6.68 de	32.80 ef
DG RI	5.95 abcd	2.17 abcde	4.61 bcde	12.75 abcde
DG FM	4.39 abc	2.16 abcd	3.22 bcde	11.06 abcd
DG CM	5.35 abcd	3.13 abcde	4.00 bcde	12.71 abcd
DG LC	3.59 a	1.17 ab	1.72 b	6.52 ab
DG sin HMA	5.05 abcd	2.85 abcde	3.59 bcde	11.20 abcd
DE RI	4.80 abc	1.86 abc	2.41 bcd	9.20 abcd
DE FM	8.53 bcdef	3.30 bcdef	5.26 cde	17.27 cdef
DE CM	5.02 abcd	2.98 abcde	3.71 bcde	12.21 abcd
DE LC	7.47 abcde	4.54 bcdef	5.64 cde	18.50 cdef
DE control	6.42 abcd	2.68 abcde	4.03 bcde	13.11 abcde
BO RI	7.89 bcde	2.34 abcd	2.06 bc	11.19 abcd
BO FM	4.26 ab	2.50 abcde	2.45 bcd	9.56 abcd
BO CM	4.97 abcd	0.79 a	0.40 a	5.50 a
BO LC	5.59 abcd	1.39 ab	1.53 ab	7.70 abc
BO sin HMA	11.18 def	3.67 bcdef	1.84 bc	15.42 abcde

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). En negritas se resaltan los tratamientos con efecto significativamente mayor en el crecimiento vegetal

Continuación del cuadro 7. Crecimiento de variedades de girasol ornamental inoculadas con hongos micorrizicos arbusculares (HMA) a los 70 días después del trasplante (época de lluvias 2017, Zapopan Jalisco).

Tratamiento	Num. Hojas	diámetro (mm)	Altura (cm)	diam.capítulo(cm)	% Micorrización
RI	13 abc	8.48 bcd	80.4 cd	7.27 cdef	63.02 de
GSA FM	14.84 abc	13.98 f	86.8 d	8.94 ef	20.14 abc
CM	13.67 abc	12.41 ef	91 d	9.35 f	72.62 e
LC	14.53 abc	8.4 bcd	78.13 bcd	5.81 abcd	49.66 bcde
sin HMA	17.5 c	10.02 d	87.24 d	7.33 def	23.75 abcd
RI	10.33 ab	8.98 cd	54.88 ab	5.67 abcd	46.68 abcde
DG FM	12.5 abc	8.55 bcd	48.58 a	5.43 abcd	45.32 abcde
CM	12.33 abc	8.04 abcd	57.33 ab	6.58 bcde	73.44 e
LC	11.17 abc	7.64 abc	48.17 a	4.72 abc	51.67 abcde
sin HMA	12.5 abc	7.89 abcd	53.5 a	5 abcd	17 ab
RI	12.33 abc	7.69 abc	50.58 a	5.42 abcd	37.36 abcde
DE FM	13.17 abc	10.05 de	60.33 abc	7.64 def	22.5 abcd
CM	13.17 abc	8.36 bcd	56.92 ab	5.25 abcd	57 cde
LC	11 abc	8.36 abcd	60.4 abc	6.6 bcdef	63 de
control	9.83 a	8.66 bcd	59.75 abc	6.26 bcde	20.57 abcd
RI	13.67 abc	7.41 abc	75.17 bcd	4.37 ab	37.93 abcde
BO FM	11 abc	6.49 ab	62.42 abcd	4.3 ab	25.66 abcd
CM	10.34 ab	6.19 ab	57.5 abc	3.08 a	33.33 abcde
LC	12.5 abc	6.08 a	62.9 abc	4.08 ab	37.36 abcde
sin HMA	16.5 bc	8.02 abcd	79.1 bcd	4.74 abcd	8.7 a

Medias con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). Variedades de girasol: GSA= Gigante doble amarilla, DE= Doble enana, DG= Doble gigante, BO= Belleza de otoño. Inóculos de HMA: Ri= *Rhizophagus intraradices*, Fm= *Funneliformis mosseae*, consorcios Cerro del Metate (CM) y Las Campesinas (LC).

Las variedades ornamentales de girasol muestran una amplia plasticidad de respuesta a la inoculación con los HMA nativos mexicanos

Para el factor variedad ornamental de girasol, el crecimiento vegetal, tanto de plantas inoculadas como de las no inoculadas con HMA, para la mayoría de las variables de respuesta sigue este orden de respuesta: GSA>DE>DG>BO. Esta tendencia sugiere una respuesta diferencial debida al genotipo intrínseco de cada variedad, bajo esta idea, las variedades GSA y BO mostraron el mayor y menor crecimiento vegetal respectivamente (Cuadro 8).

Con respecto a la respuesta de las variedades de girasol a la colonización micorrízica se presentó una tendencia $GSA=DG=DE>BO$; esto muestra que todas las variedades son capaces de establecer la asociación micorrízica, sin embargo, el grado por el cual son colonizadas es variable (**Cuadro 8**).

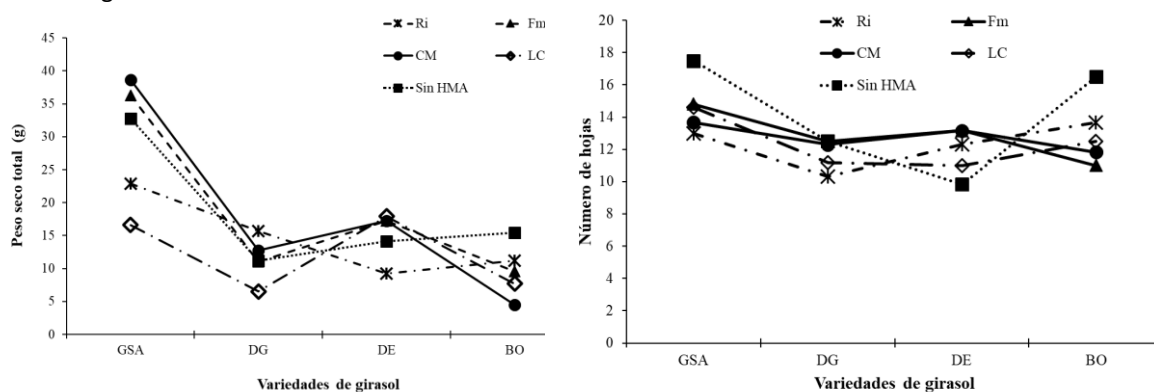
Para el factor inóculo de HMA, observando las variables de crecimiento con diferencias significativas ($P\leq 0.05$) se puede establecer una tendencia de $\text{sin-HMA}=Fm>CM=Ri>LC$; esto sugiere que los HMA tienen efectos negativos en el crecimiento vegetal de girasol ornamental, bajo este contexto el consorcio LC fue el inóculo con mayor efecto negativo, seguido por CM y Ri, mientras que Fm no mostró ningún efecto sobre el crecimiento al compararse con el testigo de plantas de girasol sin HMA (**Cuadro 8**). Mientras que para la colonización micorrízica se presentó el orden siguiente $Ri=CM=LC>Fm=\text{Sin HMA}$. Esto muestra que el inóculo Fm coloniza poco las variedades de girasol ornamental y no provoca efectos negativos en su crecimiento (**Cuadro 8**).

Lo anterior puede deberse a la interacción que existe entre los factores de estudio (variedades de girasol e inóculos de HMA) en las distintas variables de respuesta evaluadas excepto para número de hojas y colonización micorrízica ($P\leq 0.05$). Este resultado indica que las variedades de girasol responden de manera diferente a los distintos inóculos de HMA (**Cuadro 8, Figura 9**), lo que muestra una amplia plasticidad de respuesta de las variedades ornamentales de girasol a la micorrización. Esto es más claro en la información que se presenta en el **Cuadro 9**; donde se observa el efecto de los distintos inóculos de HMA en cada una de las variedades de girasol, se aprecia que hay efectos significativamente positivos ($P\leq 0.05$), por ejemplo, un incremento de 31 % del inóculo CM en la variedad GSA con respecto al tratamiento no inoculado con HMA, hasta efectos negativos, pues en la variedad BO todos los inóculos de HMA mostraron disminución del crecimiento vegetal (**Figura 9, Cuadro 9, Cuadro 10**).

Cuadro 8. Efecto de inóculos de HMA y variedades ornamentales de girasol en el crecimiento vegetal a los 70 días después del trasplante (época de lluvias; Zapopan, Jalisco).

Factor de Estudio	Peso seco (g)				Número de hojas	Diámetro tallo (mm)	Altura de planta (cm)	Diámetro de capítulo (cm)	Colonización micorrízica (%)
	Raíz	Tallo	Capítulo floral	Total					
BO	1.9 a	6.5 b	1.6 a	9.0 a	12.3 a	7.1 a	66.7 b	4.1 a	27.7 a
DE	3.0 a	6.2 b	4.1 b	13.7 b	12.0 a	8.5 b	56.2 a	6.0 b	42.7 b
DG	2.3 a	4.5 a	3.2 b	11.0 ab	11.4 a	8.1 b	52.7 a	5.5 b	46.4 b
GSA	7.8 b	13.2 c	6.7 c	28.1 c	14.9 b	10.6 c	85.8 c	7.3 c	46.8 b
Ri	3.0 ab	6.7 a	3.6 ab	13.9 ab	12.3 a	8.3 a	64.2 a	5.6 ab	46.2 b
Fm	3.6 ab	6.9 a	4.2 b	16.0 b	12.5 a	9.0 a	62.9 a	6.1 b	28.4 a
CM	3.1 ab	6.9 a	3.3 ab	12.8 ab	12.9 a	8.6 a	63.2 a	5.5 ab	59.1 b
LC	2.3 a	6.4 a	2.6 a	11.1 a	12.3 a	8.0 a	61.1 a	5.1 a	50.4 b
Sin HMA	4.3 b	8.5 a	3.7 ab	16.8 b	13.3 a	8.6 a	69.9 a	5.7 ab	17.5 a
Interacción									
F [†]	2.09	4.38	2.79	3.40	0.84	2.51	2.30	4.32	1.72
P ^{††}	0.035	0.0002	0.0060	0.0012	0.6101	0.0150	0.0219	0.0002	0.0812

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$). [†]Valor de F asociado a la Ho: No existe interacción entre el HMA y la variedad de girasol; en negritas se rechaza Ho a un nivel de significancia de 0.05. ^{††}Probabilidad observada del estadístico F.



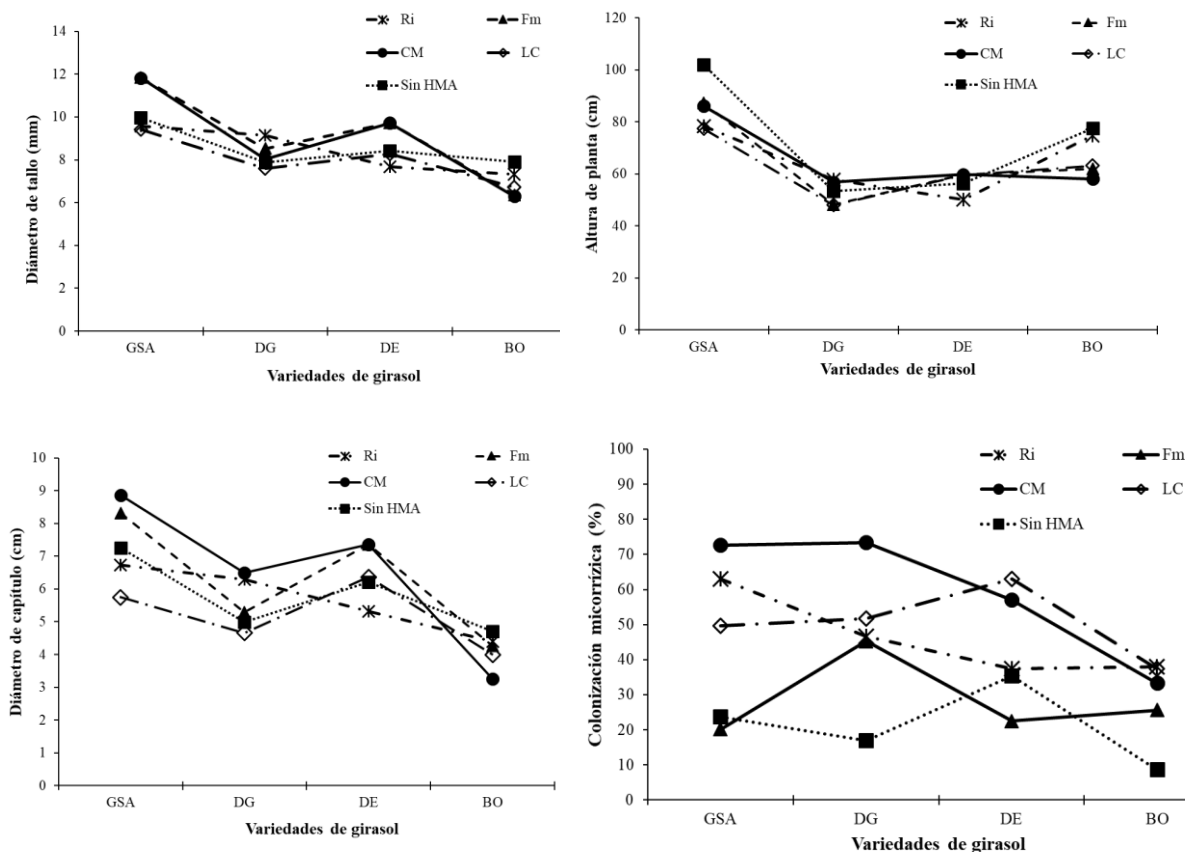


Figura 9. Interacciones entre los factores inóculo de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y variedades ornamentales de girasol en maceta a cielo abierto a los 70 días después del trasplante (época de lluvias, 2017; Zapopan, Jalisco). Variedades de girasol: GSA= Gigante doble amarilla, DE= Doble enana, DG= Doble gigante, BO= Belleza de otoño. Inóculos de HMA: Ri= *Rhizophagus intraradices*, Fm= *Funneliformis mosseae*, consorcios Cerro del Metate (CM) y Las Campesinas (LC).

Cuadro 9. Peso seco en cada variedad ornamental de girasol según el inóculo del hongo micorrízico arbuscular (HMA) inoculado a los 70 días después del trasplante en maceta a cielo abierto (época de lluvias, 2017; Zapopan, Jalisco).

HMA	Peso seco total (g) de variedades ornamentales de girasol			
	Gigante Simple Amarilla	Doble Gigante	Belleza de Otoño	Doble Enana
<i>R. intraradices</i>	23.51 (-28) ab	13.31(+18) b	11.18(-27) a	9.2(-36) a
<i>F. mossea</i>	36.98(+12) ab	11.06 (+1) ab	9.55(-37) a	17.27(+19) a
Consortio CM	43.16(+31) b	12.71(+13) b	9.53(-38) a	12.21(-15) a
Consortio LC	17.15(-48) a	6.52(-42) a	7.70(-50) a	18.07(+25) a
Sin HMA	32.80 ab	11.20 b	15.35 a	14.42 a

Medias con letras iguales en la misma columna no son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$). [†]Entre paréntesis se muestra el cálculo del incremento (+) o decremento (-) del peso fresco total respecto al control sin HMA.

La colonización micorrízica y el crecimiento vegetal están relacionados en la variedad BO

El análisis de correlación mostró un valor r de -0.4078 entre el peso seco y la colonización micorrízica para la variedad BO. Esto revela que mientras se incrementa el porcentaje de colonización micorrízica, el crecimiento de la planta es menor en la variedad de girasol BO; este efecto no se observó en las demás variedades de girasol, para las cuales los valores de correlación (r) fueron estadísticamente cero ($P \leq 0.05$), lo que sugiere que no existe relación entre la colonización micorrízica y el peso seco vegetal (**Cuadro 10**).

Cuadro 10. Coeficiente de correlación (r) entre peso fresco de cada variedad de girasol y su colonización micorrízica

	Gigante Simple Amarilla	Doble Gigante	Belleza de Otoño	Doble Enana
Correlación	-0.0583	0.1246	-0.4078	0.0889
Valor- P^\dagger	0.7866	0.5711	0.0665	0.6866

† Valor- P asociado a la $H_0: r=0$; en negritas se rechaza H_0 a un nivel de significancia de 0.08.

DISCUSIÓN

El girasol presenta una gran plasticidad en el crecimiento vegetal como efecto de la colonización micorrízica: en este estudio GSA fue estimulado por CM e inhibido por LC mientras que para la variedad DE no se encontró efecto significativo con ningún HMA (Tukey, $P \leq 0.05$); en contraste, el crecimiento de BO fue inhibido por todos los inóculos de HMA; en cambio para DG el efecto en el crecimiento fue negativo con LC. La alta variabilidad de respuestas (desde parasítica hasta mutualista) de diferentes plantas en presencia de diferentes cepas de hongos micorrízicos es un fenómeno reportado por Klironomos (2003) donde la magnitud y dirección del efecto fueron determinados por la combinación planta-hongo. Además, ninguna variedad presentó su mejor efecto con el mismo inóculo micorrízico. En el presente estudio se muestra que esta plasticidad de respuesta a los HMA no solamente se debe a la diferencia entre especies, sino también a las variedades de una misma especie vegetal. La respuesta que presenta el girasol a la colonización micorrízica, en términos de crecimiento, depende del balance entre el carbono orgánico donado al hongo y la absorción de fósforo que éste le provee a la planta

(Smith y Smith, 2012). Un efecto positivo del crecimiento se le atribuye a la absorción adecuada de fósforo de la planta a través del HMA y una respuesta negativa se atribuye a esta misma falla del hongo para proveer fósforo a la vez que consume demasiado carbono (Smith y Smith, 2012).

Un hongo micorrízico puede ser considerado como parásito de plantas cuando el costo neto de la simbiosis excede los beneficios netos. El parasitismo puede ser inducido por el desarrollo de la planta, por el ambiente o incluso puede estar determinado por el genotipo de la especie vegetal (Johnson *et al.*, 1997). La falta de luz o la fertilización con fósforo, por ejemplo, se consideran condiciones que favorecen el parasitismo por los hongos que forman micorrizas (Friede *et al.*, 2016) y que provoca que las plantas micorrizadas crezcan menos que las no micorrizadas (Daft y El-Giahmi, 1978; Ballhorn *et al.*, 2016). Sin embargo, Friede *et al.* (2016) observaron que *Hieracium pilosella* (micotrófico obligado) forma asociaciones micorrízicas de tipo mutualistas de manera consistente bajo condiciones edáficas y de suelo tanto promotoras de mutualismo como de parasitismo, mientras que *Corynephorus canescens* L (menos micotrófica) presentó una asociación pronunciada de parasitismo en todos los casos. Demostrando que el genotipo del hospedero tiene una función importante en la simbiosis micorrízica. En este caso, Belleza de Otoño es consistentemente afectada por la micorrización (independientemente del tipo de inóculo) lo cual sugiere que es un efecto del genotipo.

CONCLUSIONES

Los HMA tienen un efecto diferencial en el crecimiento vegetal según la variedad de girasol hospedera, mientras que las variedades responden según la especie o consorcio de HMA que se utilice, lo cual se traduce que cada cepa de HMA puede establecer una relación de tipo mutualista, parasítica o no mostrar efectos sobre el crecimiento de las variedades de girasol ornamentales. Belleza de Otoño mostró una relación constante de parasitismo (respecto al crecimiento) con todos los inóculos de HMA, mientras que GSA tuvo una relación de mutualismo con CM, la variedad DE no mostró efectos de la micorrización y finalmente la variedad DG tuvo relaciones de mutualismo y parasitismo.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue apoyada por proyectos de la línea de Fitopatología del CIATEJ y mediante el proyecto 293362 del CONACYT a través del Laboratorio Nacional PLANTECC. IVV agradece a CONACYT por la beca de estudios de maestría. La Dra. E. E. Quiñones-Aguilar participó como codirectora de este trabajo de tesis de maestría.

REFERENCIAS

- Ballhorn D.J., M. Schadler, J.D. Elias, J. Millar y S. Kautz (2016)** Friend or foe- light availability determines the relationship between mycorrhizal fungi, rhizobia and lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Plos ONE* 11:e0154116. doi: 10.1371/journal.pone.0154116
- Barcos A. M. S., J. J. Peña-Cabriales, A. Alarcón y V.M. Maldonado (2015)** Enhanced Pb absorption by *Hordeum vulgare* L. and *Helianthus annuus* L. plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi consortium. *International Journal of Phytoremediation* doi:10.1080/15226514.2014.898023
- Bi Y., L. Qiu, Y. Zhakypbek, B. Jiang y H. Sun (2018)** Combination of plastic film mulching and AMF inoculation promotes maize growth, yield and water use efficiency in the semiarid region of northwest China. *Agricultural Water Management*. doi: 10.1016/j.agwat.2017.12.008
- Bye R., E. Linares y D. Lentz (2009)** México: Centro de origen de la domesticación del girasol. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológica* 12:5-12.
- Corbera, J, Paneque, V. M, Calaña, J. M y Morale, C. (2008)** Evaluación de sustratos y aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el cultivo de *Anthurium andreanum* en etapa de vivero. *Cultivos Tropicales* 29(4): 27-33.
- Chandrashekara C. P., V.C. Patil y M. N. Sreenivasa (1995)** VA- mycorrhiza mediated P effect on growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) at different P levels. *Plant and Soil* 176:325-328.

- Davies T. F., J. D. Puryear, R. J. Newton, J. N. Egilla y G. J. A. Saraiva (2001)** Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Plant Physiology* 158:777-786, doi:10.1078/0176-1617-00311
- Daft M. J. y A. A. El-Giahmi (1978)** Effect of arbuscular mycorrhiza on plant growth *New Phytologist* 80:365-372, doi:10.1111/j.1469-8137.1978.tb01570.x/epdf
- Friede M., S. Unger, C. Hellmann y W. Beyschlag (2016)** Conditions promoting mycorrhizal parasitism are of minor importance for competitive interactions in two differentially mycotrophic species. *Frontiers in Plant Science* 7, doi:10.3389/fpls.2016.01465
- Gholamhoseini M., A. Ghalavand, A. Dolatabadian, E. Jamshidi y A. Khodaei-Joghan (2013)** Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on growth, yield, nutrient uptake and irrigation water productivity of sunflowers grown under drought stress. *Agricultural Water Management* 117:106-114, doi:10.1016/j.agwat.2012.11.007
- IAM-CUCEI (Instituto de Astronomía y Meteorología del Departamento de Física CUCEI Universidad de Guadalajara) (2017)** Annual climatological summary.<http://astro.iam.udg.mx/estacion/NOAAPRYR.TXT> (enero 2017).
- Hassan S. E., M. Hijri and M. St-Arnaud (2013)** Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. *New Biotechnology* 30:780-788, doi:10.1016/j.nbt.2013.07.002
- Hernández-Cuevas, L. V.; Guadarrama-Chavez, P.; Sánchez-Gallen, I. y Ramos-Zapata, J. (2012)** Micorriza arbuscular, colonización intrarradical y extracción de esporas de suelo. In. *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. Álvarez S. J. y Monroy A. A. (Comps.). Fac. de Ciencias UNAM. DF, México. 1-16 pp.
- Johnson N. C., J. H. Graham and F. A. Smith (1997)** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575-585, doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00729.x
- Khan A. G. (2006)** Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 7:503-514, doi:10.1631/jzus.2006.B0503

- Klironomos, J. N. (2003)** Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84: 2292–2301, doi:10.1890/02-0413
- Ley-Rivas J. F., J. A. Sánchez, N. E. Ricardo y E. Collazo (2015)** Efecto de cuatro especies de hongos micorrizógenos arbusculares en la producción de frutos de tomate. *Agronomía Costarricense* 39:47-59.
- Lingua G., E. Bona, V. Todeschini, C. Cattaneo, F. Marsano, G. Berta y M. Cavaletto (2012)** Effects of heavy metals and arbuscular mycorrhiza on the leaf proteome of a selected poplar clone: a time course analysis. *Plos ONE* 6:e38662, doi:10.1371/journal.pone.0038662
- Liriano González, R., D. Núñez Sosa y R. Barceló Díaz (2012).** Efecto de la aplicación de Rhizobium y Mycorriza en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L) variedad CC-25-9 negro.
- Martinez-García L. B., S. J. Richardson, J. M. Tylianakis, D. A. Peltzer y I. A. Dickie (2015)** Host identity is a dominant driver of mycorrhizal fungal community composition during ecosystem development. *New Phytologist* 205:1565-1576, doi: 10.1111/nph.13226.
- Mehrotra V. S. y U. Baijal (1995)** Effects of single and mixed inocula of VAM fungi on the growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Philippine Journal of Science* 124:183-201.
- Moreno M. E. (1996)** Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 3^{ra} ed., UNAM, México DF. 393 p.
- Parra M., M. Sánchez de Prager y E. Sieverding (1990)** Efecto de micorriza vesículo-arbuscular en café (*Coffea arabica* L.) variedad Colombia en almacigo. *Acta Agronomica* 40:88-99, doi:10.15446/acag
- Phillips J. M. y D. S. Hayman (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* 55:158-161, doi:10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Quiñones-Aguilar E. E., E. Hernández-Acosta, G. Rincón-Enríquez y R. Ferrera-Cerrato**

- (2012) Interacción de hongos micorrízicos arbusculares y fertilización fosfatada en papaya. *Terra Latinoamericana* 30:165-176.
- Smith S. E. y A. Smith (2012)** Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104:1-13, doi:10.3852/11-229
- Soleimanzadeh H. (2010)** Effect of VA-Mycorrhiza on growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L) at different phosphorus levels. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering* 4:820-823.
- Soroa, M. R., Cortés, S. L. y Hernández, A. (2003)** Estudio del efecto de la aplicación de biofertilizantes sobre algunas variables de crecimiento y rendimiento en *Gerbera jamesonii* cv. Bolus. *Cultivos tropicales* 24(2): 15-17
- Souza T. (2015)** Handbook of arbuscular mycorrhizal fungi. Springer. Coimbra, Portugal. 378 p. doi:10.1007/978-3-319-24850-9
- StatPoint Inc. (2005)** StatGraphics Centurion XV version 15.02.06. Warrenton, Virginia, USA. www.statgraphics.com
- Trejo D., R. Ferrera-Cerrato, R. García, L. Varela, L. Lara y A. Alarcón (2011)** Efectividad de siete consorcios nativos de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de café en condiciones de invernadero y campo. *Revista Chilena de Historia Natural* 84:23-31.
- Trinidad-Cruz J. R., E. E. Quiñones-Aguilar, L. V. Hernández-Cuevas, L. López-Pérez y G. Rincón-Enríquez (2017)** Hongos micorrízicos arbusculares asociados a la rizósfera de *Agave cupreata* Trel. & Berger en regiones mezcaleras del estado de Michoacán, México. *Scientia Fungorum* 45:13-25.
- Van der Heijden M. G. A., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller I., R. Sanders (1998)** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69-72, doi:10.1038/23932
- Vangelisti A., L. Natali, R. Bernardi, C. Sbrana, A. Turrini, K. Hassani-Pak., . . . T. Giordani (2017)** Transcriptome changes induced by arbuscular mycorrhizal fungi in sunflower (*Helianthus annuus* L.) roots. *Scientific reports* 8, doi:10.1038/s41598-017-18445-0.

- Wilson G. W. T. y C. Hartnett (1997)** Effects of mycorrhizae on plant growth and dynamics in experimental tallgrass prairie microcosms. *American Journal of Botany* 84:478-482.
- Yañez, P., H. Ohno y K. Ohkawa (2004)** Effect of photoperiod on flowering and growth of ornamental sunflower cultivar. *Environmental Control in Biology* 42(4): 287-293, doi:10.2525/ecb1963.42.287
- Zangaro W., J. M. Domingues Torezan, L. Vergal Rostirola, P. Bochi de Souza y M. A. Nogueira (2015)** Influence of mycorrhizas, organic substrates and container volumes on the growth of *Heliocarpus popayanensis* Kunth. *CERNE* 21:395-403, doi:10.1590/01047760201521031335

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS AL CAPITULO III

El engrosamiento del tallo es influenciado por la micorrización

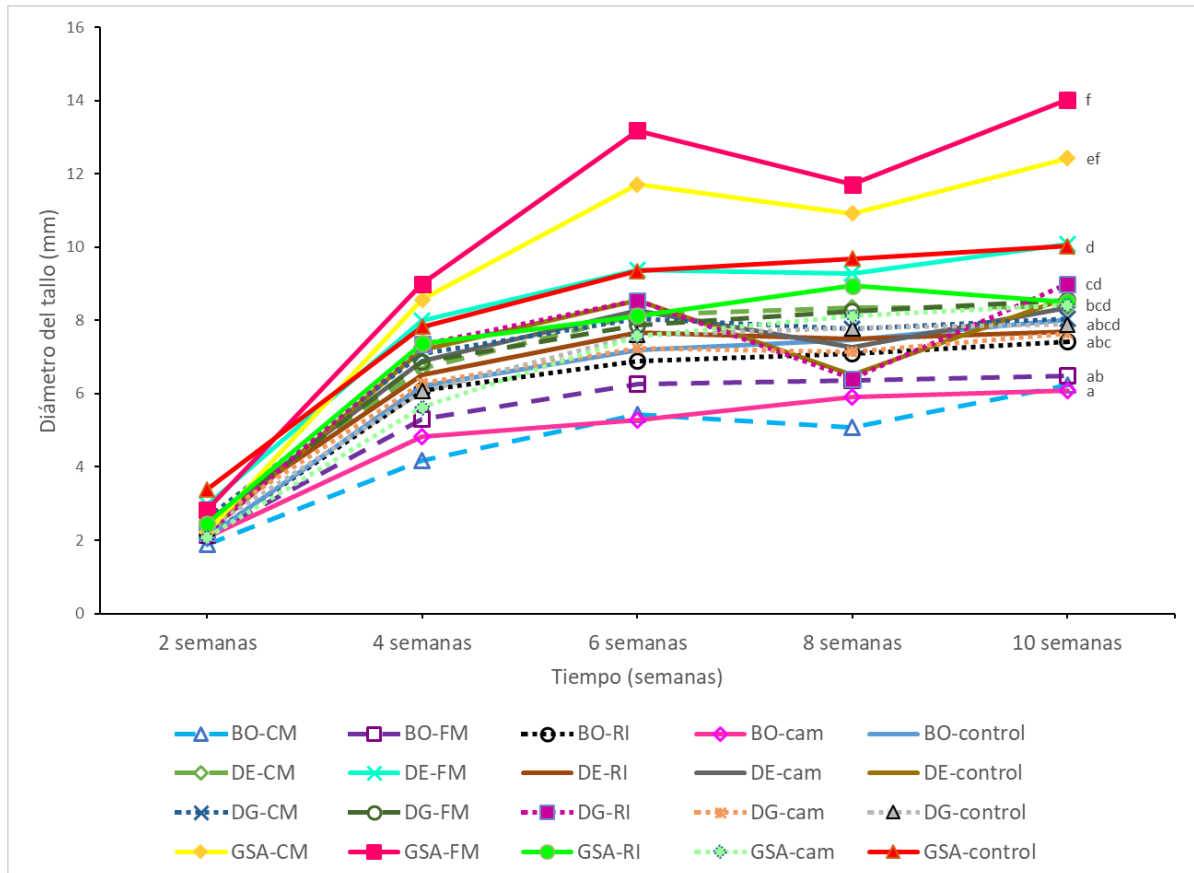


Figura 10. Efecto de la micorrización sobre el diámetro del tallo en plantas ornamentales de girasol en el transcurso del experimento (mediciones a las 2, 4, 6, 8 y 10 semanas). Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0.05$).

Hay un cambio en el patrón de crecimiento a partir de las 4 semanas de experimentación: las plantas se elongan más rápidamente, y la velocidad de engrosamiento de tallo y de generación de hojas decrece. El engrosamiento del diámetro de GSA es estimulado por los inóculos *Funneliformis mosseae* y Cerro del Metate según Tukey ($P \leq 0.05$) (Figura 10).

La micorrización aceleró la floración en Belleza de Otoño

Las plantas presentaron diferenciación del ápice a partir de la semana 6 de experimentación. Las variedades dobles florecen antes que las simples. Belleza de Otoño es la que más tarda en florecer. La micorrización aceleró la floración en Belleza de Otoño a las 8 semanas de experimentación (**Figuras 11, 12, 13**). Estos efectos fueron comprobados por Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$).

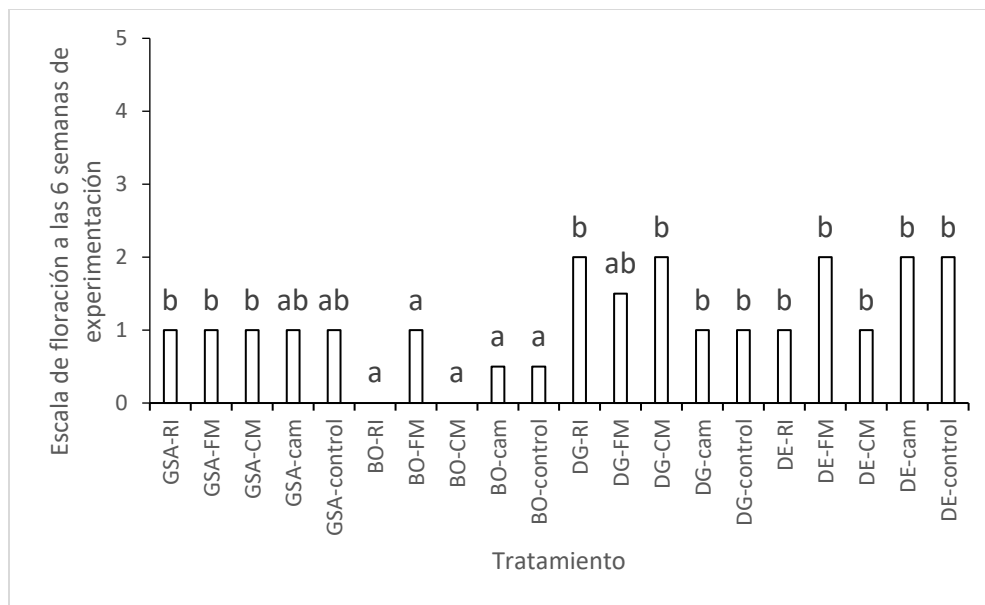


Figura 11. Estado de la floración a las 6 semanas de haber inoculado las plantas con HMA dónde: 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se pueden observar los granos formados. Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$).

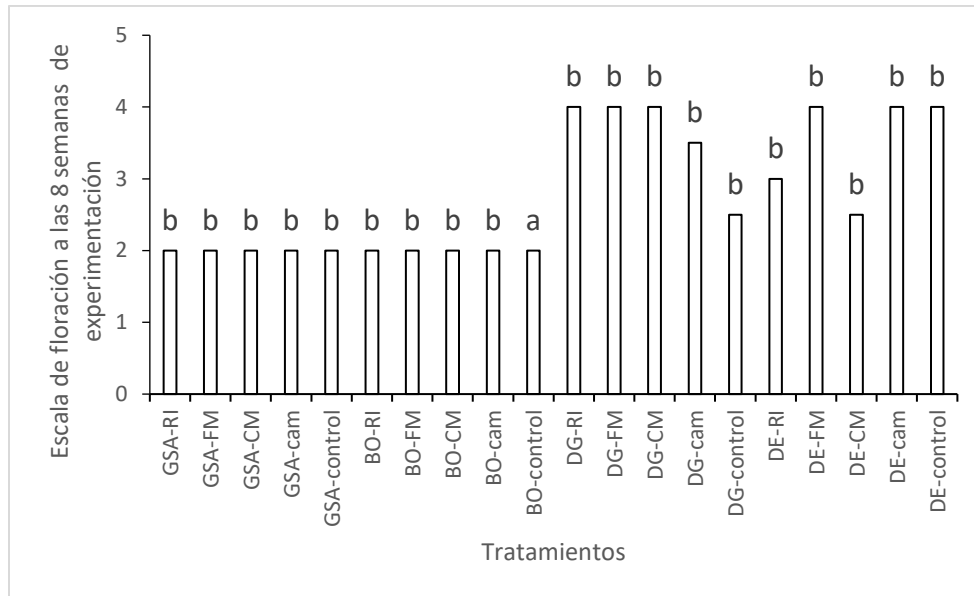


Figura 12. Estado de la floración a las 8 semanas de haber inoculado las plantas con HMA dónde 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se pueden observar los granos formados. Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$).

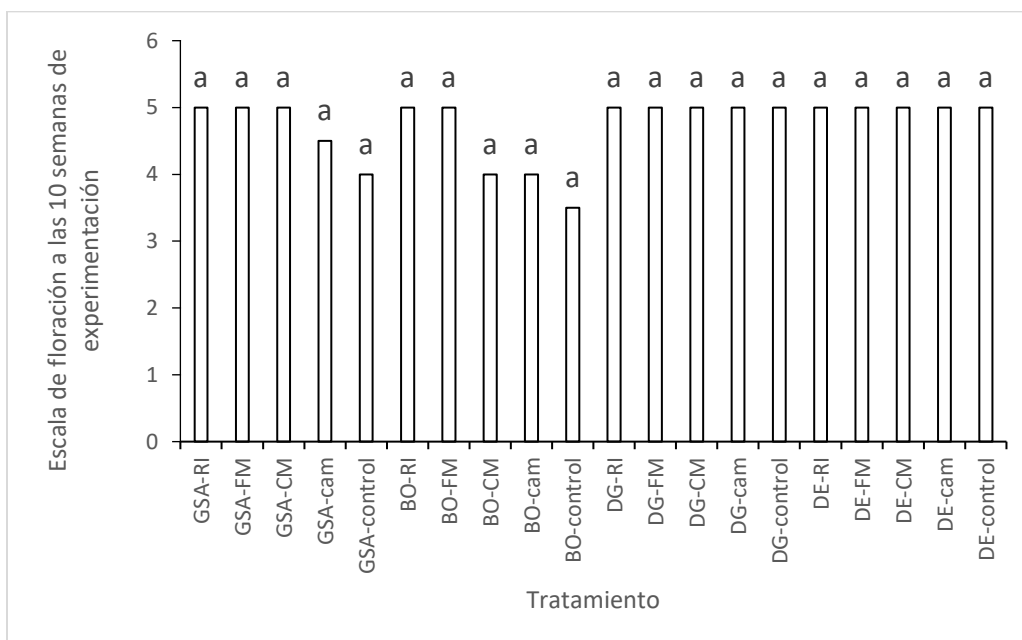


Figura 13. Estado de la floración a las 10 semanas de haber inoculado las plantas con HMA dónde 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se pueden observar los granos formados. Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$).

Considerar el número de días desde la emergencia de las plantas hasta la floración es de suma importancia para programas de mejoramiento en girasol. La floración es un rasgo complejo que está determinado por el genotipo, las condiciones ambientales y la interacción entre ambos. El fotoperiodo y la temperatura tienen efectos mayores sobre este rasgo y pueden ser una fuente de interacción genotipo- ambiente (Leon *et al.*, 2001). Por ejemplo, Blackman *et al.* (2011) observaron diferencias en los tiempos de floración de girasoles silvestres que habían genéticamente evolucionado con respecto a los fotoperiodos de su ecosistema. Lo anterior es consistente con el presente estudio en el cual las variedades dobles florecen antes que las simples y Belleza de Otoño es la que más tarda en florecer.

Con respecto al factor micorriza existen pocos estudios que relacionan la floración con la simbiosis micorrízica. Se sabe, sin embargo, que en algunas plantas como la gerbera la micorriza puede aumentar el diámetro floral hasta un 27% y adelantar la floración 50 días (Soroa *et al.*, 2003). En este caso la micorrización solamente aceleró la floración de Belleza de Otoño a las 8 semanas de experimentación.



Figura 14. Aspecto general del experimento de girasol con distintos inóculos de hongos micorrícicos en condiciones de cielo abierto en Zapopan Jalisco, a las 3 semanas después de haber iniciado el experimento

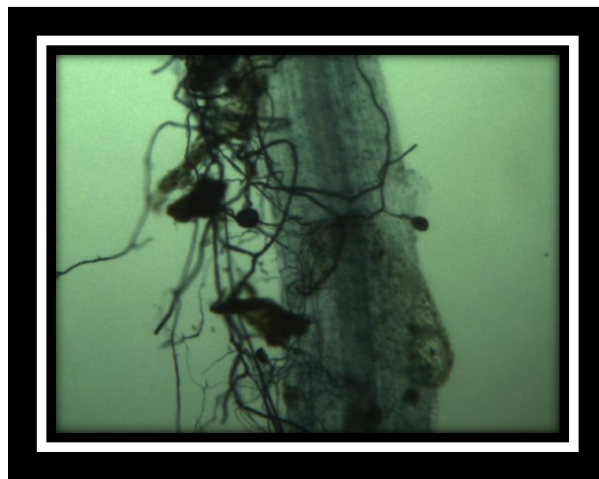









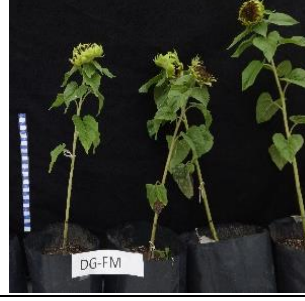



Figura 15. Raíz de girasol doble enana colonizada por el consorcio campesinas en un experimento de micorrización en condiciones de cielo abierto, época de lluvias, Zapopan, Jalisco

Variedad/cep a	Control	Cerro del Metate	<i>F.mosseae</i>	<i>R. intraradices</i>	Las Campesinas
Gigante Simple Amarillo					
Belleza de Otoño					
Doble Gigante					

Doble Enana



Figura 16. Comparación de tratamientos de girasoles ornamentales micorrizados con distintos inóculos en condiciones de cielo abierto en Zapopan Jalisco, a las 10 semanas después de haber iniciado el experimento.

REFERENCIAS

- Blackman, B. K., S. D. Michaels y L. H. Rieseberg (2011)** Connecting the sun to flowering in sunflower adaptation. *Molecular ecology* 20(17): 3503-3512. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05166.x
- Leon, A., M. Lee y F. Andrade (2001)** Quantitative trait loci for growing degree days to flowering and photoperiod response in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 102 (4): 497-503. doi:10.1007/s001220051673
- Soroa, M. R., Cortés, S. L. y Hernández, A. (2003)** Estudio del efecto de la aplicación de biofertilizantes sobre algunas variables de crecimiento y rendimiento en *Gerbera jamesonii* cv. Bolus. *Cultivos tropicales* 24(2): 15-1

CAPÍTULO IV

Viabilidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares y semillas de girasol para el establecimiento de la simbiosis micorrízica

Viability of spores of arbuscular mycorrhizal fungi and sunflower seeds for the establishment of mycorrhizal symbiosis

Isabel Vital-Vilchis¹, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar¹, Luis Guillermo Hernández-Montiel² y Gabriel Rincón-Enríquez^{1, *}

¹Laboratorio de Fitopatología de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, México, C.P. 45019. Tel. (33) 33455200. ²Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, BCS, México, C.P. 23096.

*Autor para correspondencia (grincon@ciatej.mx)

RESUMEN

Dentro de las semillas de plantas y las esporas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), la viabilidad celular se va perdiendo con respecto al tiempo y a las condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa. La viabilidad celular influye sobre la germinación tanto de las semillas como de esporas de HMA y sobre la capacidad de colonización de estas últimas. El objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad de semillas de girasol y de esporas de HMA almacenadas a temperatura ambiente, para posteriormente establecer la simbiosis entre ellos. Semillas de tres variedades de girasol ornamental (1 año de almacenamiento) y dos inóculos de HMA (dos años de almacenamiento) a temperatura ambiente, se les determinó su viabilidad empleando la técnica de tetrazolio. Posteriormente se realizó, un experimento complementario al azar bifactorial con tres niveles de HMA y dos variedades de girasol,

generando así seis tratamientos, los cuales se repitieron 6 veces. A los 20 días después de inoculadas las plantas, se evaluó la altura de planta, diámetro de tallo, peso fresco de la planta y colonización micorrízica. Las variedades de girasol mostraron que después de un año de almacenamiento, pierden la viabilidad en un 90% (Gigante Simple Amarilla) y un 40% (Belleza de Otoño y Doble Gigante); mientras que las esporas de los inóculos de HMA mostraron la misma viabilidad (Tukey, $p \leq 0.05$) comparada con un inóculo recién cosechado. Los HMA a los 20 días después de iniciado el experimento no lograron establecer la colonización micorrízica y no mostraban efecto en el crecimiento de las plantas (Tukey, $p \leq 0.05$). Estos resultados sugieren que, en girasol, los tiempos de colonización micorrízica en condiciones de campo en maceta con inóculos conservados durante periodos largos son mayores a 3 semanas de simbiosis, mientras que la viabilidad de las esporas de HMA se mantiene a través del tiempo y en semillas de girasol se puede perder rápidamente dependiendo de la variedad.

Palabras clave: prueba de tetrazolio, almacenamiento, latencia, esporas de HMA, semillas, viabilidad celular.

SUMMARY

Cell viability of plant seeds and of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores is lost through time and due to environmental conditions such as temperature and relative humidity. Cell viability has a roll over germination of both, seeds and AMF spores, and over the colonization capacity of these last ones. The objective of this work was to determine the viability of sunflower seeds and of AMF spores, after being stored at room temperature, for further establishment of symbiosis with one another. Cell viability of three ornamental sunflower seed varieties (one-year long storage) and of two AMF inoculums (2 years long storage) at room temperature was determined with the tetrazolium test. Later, a bifactorial randomly complemented experiment was carried out with three levels of AMF and two sunflower varieties. The experiment consisted of six treatments with six replicates each. Twenty days after inoculation with AMF, plant's height, stem diameter, fresh weight and mycorrhizal colonization were evaluated.

Sunflower showed a loss in cell viability, after 1 year of storage, of 90% (Gigante Simple Amarillo) and of 40% (Belleza de Otoño y Doble Gigante); meanwhile, AMF spores showed to keep their viability (Tukey, $p \leq 0.05$) after storage compared with a freshly harvested inoculum. The AMF, after 20 days after inoculation, did not show effects over sunflower growth and did not establish mycorrhizal colonization (Tukey, $p \leq 0.05$). These results suggest that, in sunflower, timing for mycorrhizal colonization in flower pot in field conditions with inocula conserved for long periods takes longer than 3 weeks to establish symbiosis, while the viability of the AMF spores is maintained over time, sunflower seeds viability can be lost quickly depending on the variety.

Key words: tetrazolium test, storage, latency, AMF spores, seeds, cell viability.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento de las semillas consiste en el deterioro de las estructuras y funciones de la semilla con respecto al tiempo, de manera que, se va perdiendo la viabilidad (las semillas van muriendo). El envejecimiento puede ser causado por factores exógenos; por ejemplo, en semillas ortodoxas como el girasol, la temperatura y la humedad reducen la longevidad (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994) o por factores endógenos, por ejemplo, la metilación del ADN es crítica para la regulación de la embriogénesis vegetal y para la viabilidad de semillas (Xiao *et al.*, 2006). Al igual que las semillas, los propágulos de hongos micorrízicos arbusculares también son susceptibles a los cambios de temperatura y humedad relativa (Lekberg y Koide, 2008).

La prueba de tetrazolio es un método establecido y rápido para determinar la viabilidad de células, esporas, semillas y tejidos en general. Todos los tejidos que respiran son capaces de convertir el reactivo incoloro 2,3,5 trifenil cloruro de tetrazolio, en un compuesto no soluble de color rojo carmín llamado formazan. Lo anterior sucede a través de una reacción de transferencia de hidrógeno por deshidrogenasas celulares. Así, las células vivas cambiarán de color mientras el tejido muerto (dañado o envejecido) permanecerá sin teñir (Verma y Majee, 2013; Verma *et al.*, 2013). También se pueden

usar otras sales de tetrazolio como el MTT [bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] que viran a un color azul (An y Hendrix, 1998).

La viabilidad y el porcentaje de germinación tanto de semillas como de esporas de hongos son conceptos diferentes ya que, semillas o esporas viables (vivas) pueden germinar o no dependiendo de las condiciones externas como temperatura, humedad y oxigenación del suelo, entre otros factores (Daniels y Trappe, 1980). Puede ser también que, la semilla o spora no esté germinando por presentar un estado de dormancia o latencia fisiológica (Tommerup, 1983; Navarro y González, 1999).

Para el caso de los hongos micorrízicos arbusculares, la colonización depende no sólo de las condiciones climáticas o de la viabilidad del inóculo. También, se deben considerar los nutrientes del suelo, la especie de hongo, la especie de planta y su interacción. Para ilustrar lo anterior se puede comparar un estudio en trigo, frijol y vegetación de pradera (*Lolium multiflorum* cv. Tetrone y *Trifolium pratense* cv. Quiñequeli), en el cual la adición de composta (rica en fósforo) aumentó la colonización micorrízica (Millaleo *et al.*, 2006). Mientras que Mäder *et al.* (2000) encontraron una relación inversa entre la disponibilidad de P con el porcentaje de colonización de las raíces de trigo. Alarcón y Ferrera-Cerrato (2003), no encontraron diferencias significativas en la colonización entre tratamientos con y sin fósforo en *Citrus volkameriana*; sin embargo, el mejor tratamiento con respecto al crecimiento fue, el que incluía la fertilización fosfatada con los inóculos micorrízicos.

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue, determinar la viabilidad de semillas de tres variedades de girasol (*Helianthus annuus*) de un año de almacenamiento, y de esporas de dos inóculos de HMA de dos años de almacenamiento a temperatura ambiente para posteriormente establecer la simbiosis entre ellos en condiciones de campo en maceta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la viabilidad de semillas de girasol y esporas de HMA

Se tomaron muestras de semillas de girasol de las variedades ornamentales Gigante Simple Amarillo (GSA), Doble Gigante (DG) y Belleza de Otoño (BO) de la

compañía Vita[®], que contaban con envejecimiento natural de un año a temperatura ambiente (14.8 y 28.5 °C como temperaturas mínima y máxima, respectivamente). A las semillas se les retiró la testa manualmente y se colocaron en una solución de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (0.25 mg mL⁻¹) y se incubaron 24 horas según el procedimiento de An y Hendrix (1998). Se realizó un experimento de viabilidad de las semillas de girasol completamente al azar con tres tratamientos (GSA, DG, BO) y la unidad experimental se conformó de 13 semillas, las cuales se colocaron en una caja Petri de 90X15 con un fondo de papel filtro estéril, se realizaron 3 repeticiones. Las cajas Petri se incubaron a 28°C por 24 h. Se cuantificó el número de semillas que cambiaron a color azul (viable).

Se emplearon inóculos de HMA de *Funneliformis mosseae* (Fm) y del consorcio Cerro del Metate (CM) (Trinidad *et al.*, 2017), de dos años de almacenamiento (temperatura ambiente, humedad relativa 20-30% y en oscuridad) y recién cosechadas de una propagación durante 8 meses bajo invernadero en macetas trampas empleando sorgo (*Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanese* Sweet Chow; Western Seed Co.) como planta hospedera. Las esporas de HMA se extrajeron por agitación mecánica y tamizado de acuerdo con el protocolo propuesto por Hernández *et al.* (2012). Se realizó un experimento de la viabilidad de las esporas de HMA en un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (Fm-2 años; CM-2 años; Fm-nueva y CM-nueva) y la unidad experimental se conformó de 50 esporas y se realizaron 3 repeticiones. Las esporas se colocaron con una solución de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (0.25 mg mL⁻¹) y se incubaron durante 36 horas en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL a 28°C en oscuridad. Se cuantificó las esporas que cambiaron a color azul (viable) después de las 36 horas de incubación.

Simbiosis micorrízica de plantas de girasol con inóculos de HMA

El experimento se realizó a la intemperie, en las instalaciones del Centro de Investigación y de Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Unidad Zapopan N 20° 42' 5.97'', W 03° 28' 25.83''; durante la primavera de 2018 (marzo a abril). La temperatura promedio fue 23.1 °C con una máxima promedio de 32.2 °C y mínima de

13.9 °C (IAM-CUCEI, 2019).

El experimento consistió en dos factores: el primero las variedades de girasol ornamental Belleza de Otoño (BO) y Gigante Simple Amarilla (GSA) de la compañía Vita® y como factor dos, tres niveles de inóculos de HMA: *Funneliformis mosseae* (Fm-2 años); consorcio Cerro del Metate (CM-2 años) y sin HMA. Estos seis tratamientos con 6 repeticiones se establecieron en un diseño completamente al azar bajo condiciones de campo en macetas.

Las semillas de las variedades de girasol se germinaron con la técnica de “tacos de germinación” según lo recomendado por Moreno (1996) durante 5 días en condiciones de oscuridad a 25 °C en una cuarto de incubación. Las plántulas germinadas de aproximadamente 6 cm de longitud y con sólo sus cotiledones, se trasladaron en bolsas negras de polietileno calibre 400 (15x15 cm) que contenían 350 g de sustrato estéril (120°C, 1.05 kg cm⁻², 6 h), el cual fue una mezcla de peat-moss, humus de lombriz y suelo agrícola [70:10:20 (v/v/v)]. A cada plántula se les inóculo 80 esporas viables de HMA al momento de trasplante. La duración del experimento fue de 20 días en condiciones de campo durante la etapa de primavera y al final, se registraron las variables de respuesta: altura de planta, número de hojas, peso fresco de la planta y colonización micorrízica de acuerdo con el protocolo Hernández *et al.* (2012). La información obtenida fue analizada mediante un análisis de varianza de una vía o multifactorial ($p \leq 0.05$) y cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias Tukey ($p \leq 0.05$); ambos análisis fueron realizados empleando el programa Statgraphics Centurion (Statgraphics, 2005).

RESULTADOS

La viabilidad para los inóculos micorrízicos arbusculares mostró diferencias significativas según la prueba estadística Tukey ($p \leq 0.05$). El consorcio Cerro del Metate, tanto recién cosechado como con 2 años de almacenamiento tuvo menor viabilidad que *Funneliformis mosseae*. Los inóculos conservan su viabilidad igual después de 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente (Tukey, $p \leq 0.05$) (**Cuadro 11, Cuadro 12, Figura**

17). Se encontró una interacción entre el tipo de inóculo (mono o multi especie) y el tiempo de almacenamiento de las esporas de los HMA (**Cuadro 12**).

Cuadro 11. Viabilidad de esporas de diferentes inóculos micorrízicos recién cosechados y con 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente.

Inóculo de HMA	Condición de almacenamiento	Viabilidad de esporas (%)
<i>Funneliformis mosseae</i>	2 años	87.0 a
<i>Funneliformis mosseae</i>	Recién cosechado	76.8 ab
Cerro del Metate	2 años	53.2 b
Cerro del Metate	Recién cosechado	74.3 ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuadro 12. Efecto del almacenamiento a temperatura ambiente sobre la viabilidad de las esporas de hongos micorrízicos arbusculares.

Factor de estudio: inóculo de HMA	Viabilidad de esporas (%)
Cerro del Metate	63.7 a
<i>Funneliformis mosseae</i>	82.0 b
Factor de estudio: almacenamiento	
2 años	70.1 a
Recién cosechados	75.6 a
Interacción entre los factores de estudio	
Estadístico F	0.0613
Vapor de probabilidad (P value)	0.0384

Letras distintas en el mismo factor de estudio indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En el caso de las semillas de *Helianthus annuus*, las variedades Belleza de Otoño y Doble Gigante presentaron la mayor viabilidad con respecto a la variedad Gigante Simple Amarillo, es decir, esta última variedad pierde rápidamente la capacidad de germinación (Tukey, $p \leq 0.05$) (**Cuadro 13**).

Cuadro 13. Porcentaje de viabilidad de las semillas de variedades ornamentales de girasol después de un año de almacenamiento.

Varietal de girasol ornamental	Viabilidad de las semillas (%)
Gigante Simple Amarillo	10.3 a
Doble Gigante	57.1 b
Belleza de Otoño	66.6 b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

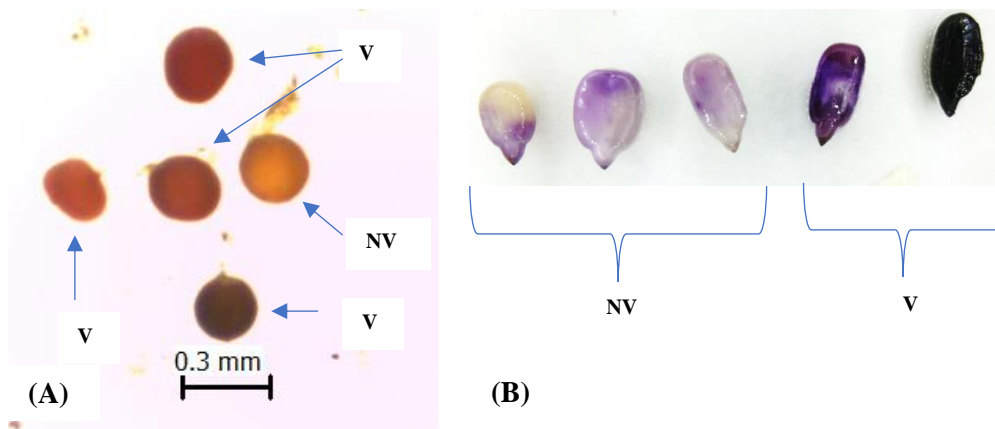


Figura 17. Esporas de hongos micorrízicos arbusculares (A) y semillas de girasol ornamental (B) después de las 24 horas de la prueba de viabilidad con el reactivo 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. Las estructuras vivas, en el caso de las esporas hay un cambio de coloración de amarillo a tonos rojizos; mientras que en las semillas de girasol el cambio es de blanco a azules. V= estructuras viables, NV = Estructuras no viable.

No se observó efecto de los HMA sobre el crecimiento vegetal, a los 20 días después de la inoculación entre tratamientos con respecto al testigo sin HMA dentro de la misma variedad de girasol (**Cuadro 14**). La determinación de la colonización micorrízica a los 10 y 20 días después de la inoculación, no mostró colonización; aunque, se observó algunas esporas de los HMA en proceso de germinación (**Figura 18**).

Cuadro 14. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares sobre el crecimiento de variedades de girasol ornamental 20 días después de inoculado en condiciones de cielo abierto durante la estación de la primavera.

Tratamiento		Altura de	Número	Diámetro	Peso	Porcentaje
Variedad de girasol	Inóculo de HMA	planta (cm)	de hojas	de tallo (mm)	fresco de planta (g)	de colonización
Belleza de Otoño	Fm	25.1 a	9.6 a	2.6 a	10.8 a	0 a
	CM	23.0 a	10.0 a	2.9 ab	8.7 a	0 a
	Sin HMA	25.5 a	11.0 a	3.2 ab	17.0 a	0 a
Gigante	Fm	37.3 b	13.0 a	4.2 b	454.6 b	0 a
Simple	CM	38.2 b	11.3 a	4.1 b	258.0 b	0 a
Amarilla	Sin HMA	42.5 b	13.0 a	3.8 ab	331.0 b	0 a

Fm= *Funneliformis mosseae*; CM= consorcio Cerro del Metate. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

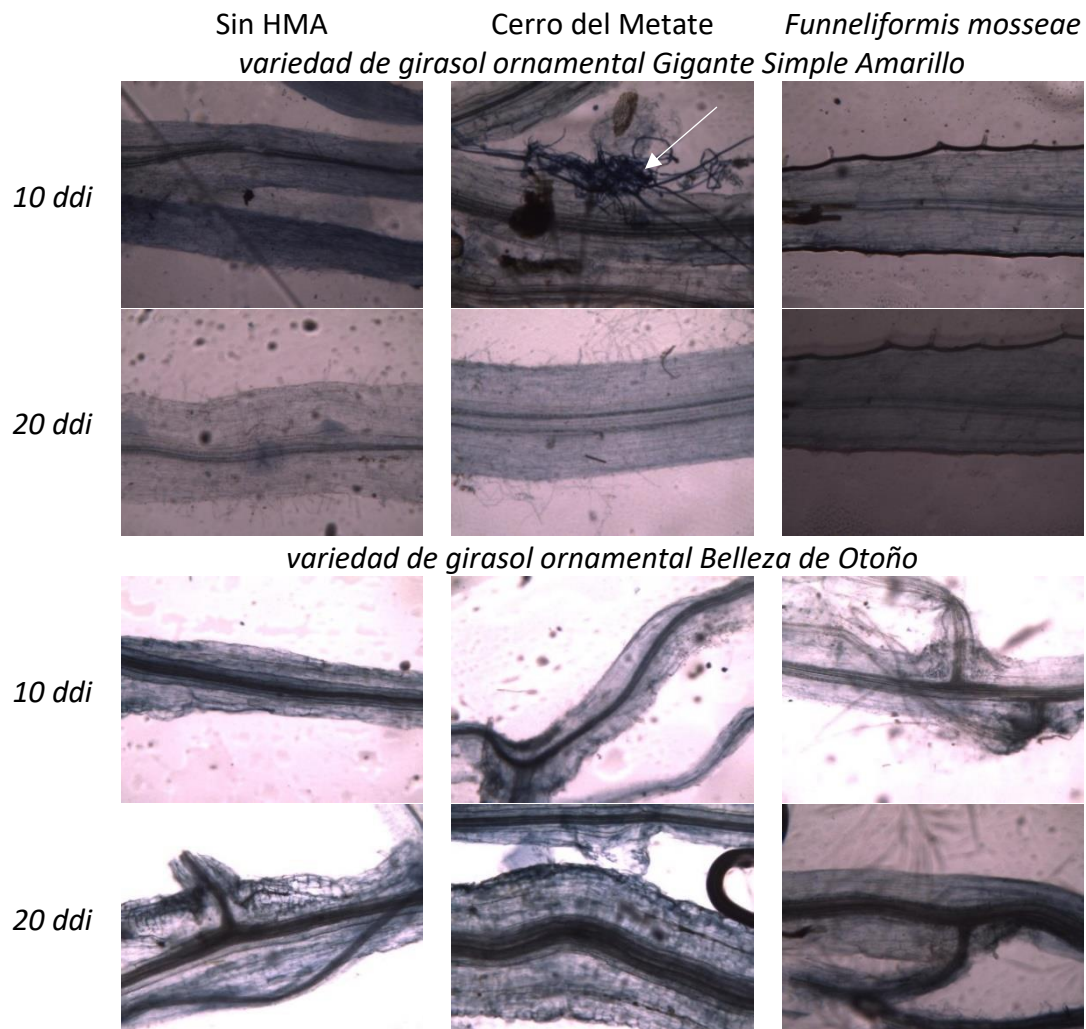


Figura 18. Raíces de dos variedades de girasol ornamental inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares a los 10 y 20 días después de la inoculación (ddi) en condiciones de cielo abierto durante la estación de primavera. La flecha indica posibles esporas de HMA en proceso de germinación (Cerro del Metate en Gigante Simple Amarilla a los 10 ddi).

DISCUSIÓN

El hecho de que las esporas se mantengan viables después de dos años, es consistente con el producto comercial Safer Micorrizas M.A.® cuya vida de anaquel es de dos años, almacenando el producto en un ambiente fresco, seco y protegido de los rayos directos del sol. Sin embargo, la colonización micorrízica es nula a los 20 días después de la inoculación; esto es consistente con el estudio de Fernández *et al.* (2005) que determinó que, las especies *Glomus mosseae* y otra especie de *Glomus* sp. necesitan

entre 7 y 30 días para germinar *in vitro*. Por otro lado, se ha demostrado que se puede estimular la germinación de las esporas y así acelerar la colonización agregando estrigolactonas al sustrato (Besserer *et al.*, 2006) aunque faltan más estudios en girasol.

Respecto a la viabilidad de las semillas, De Castro-Lima *et al.* (2014) afirman que, las condiciones ambientales no son apropiadas para almacenar las semillas de girasol porque pierden fácilmente la viabilidad. Las semillas continúan viables por 12 meses en un cuarto seco y con enfriamiento (refrigeración), independientemente del tipo de empaque que se use.

En este caso, la variedad Gigante Simple Amarilla fue la menos viable probablemente por ser la variedad con la semilla más grande lo cual puede contribuir a deshidratarse y por tanto morir el embrión. Cabe mencionar que Nagel y Borner (2009), encontraron una relación negativa entre el contenido de grandes cantidades de aceite en semilla y la longevidad de ésta, mientras que el contenido de carbohidratos y de proteínas no afectó la longevidad y el girasol es una semilla oleaginosa; sin embargo, en el caso de la variedad GSA no importó la aparente alta cantidad de aceite (según el tamaño grande de semilla) en la disminución tan drástica de la viabilidad lo cual sugiere que otros factores genéticos también pudieran estar implicados en alargar la viabilidad de las variedades de esta especie ornamental. En este sentido, Ellis y Roberts (1980) indican que, efectivamente la viabilidad también es dependiente de las variaciones genéticas dentro de una misma especie y de las condiciones previas al almacenamiento. Lo cual concuerda plenamente con los resultados encontrados en el presente estudio, dado que mientras la variedad GSA casi perdió toda su viabilidad (90%), las otras dos variedades solo sufrieron un daño del 50%. Finalmente, respecto a la colonización micorrízica no observada en las plantas de girasol pudo deberse a la disponibilidad de nutrimentos, sobre todo fósforo, contenido en el humus de lombriz aplicado en el sustrato de establecimiento del experimento o también a que el sustrato empleado fue muy orgánico.

CONCLUSIONES

Las esporas de hongos micorrízicos arbusculares almacenados hasta por 2 años, pueden ser usados como inóculos para plantas porque conservan su viabilidad. Sin embargo, es necesario realizar más estudios en condiciones controladas para determinar el tiempo que tarda una espora viable de los inóculos estudiados en colonizar a variedades ornamentales de *Helianthus annuus* así como, las condiciones ideales para favorecer este proceso. Las semillas de girasol pierden rápidamente su viabilidad y la rapidez con la que sucede esto está en función de la variedad de la especie con la que se investigue.

AGRADECIMIENTOS

IVV agradece a CONACYT por la beca para estudios de maestría otorgada. Esta investigación fue apoyada por proyectos del Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ y mediante el proyecto 293362 del CONACYT a través del Laboratorio Nacional PLANTECC. La Dra. E. E. Quiñones-Aguilar participó como codirectora de este trabajo de tesis de maestría.

REFERENCIAS

- Alarcón A y R. Ferrera-Cerrato (2003)** Aplicación de fósforo e inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y estado nutricional de *Citrus volkameriana*. *Terra Latinoamericana* 21: 91-99.
- An Z. Q. y J. W. Hendrix (1988)** Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* 80: 259-261.
- Besserer A., V. Puech-Pagès, P. Kiefer, V. Gomez-Roldan, A. Jauneau, S. Roy, J. C. Portais, C. Roux, G. Bécard y N. Séjalon-Delmas (2006)** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLOS biology* 4: e222-e226.
- Daniels B. A. y J. M. Trappe (1980)** Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *glomus epigaeus*. *Mycologia* 72: 457-471.

- De Castro-Lima D., A. S. Dutra, F. Moura-Pontes y F. Thiago-Coelho-Bezerra (2014)** Storage of sunflower sedes. *Revista Ciencia Agronómica* 45: 361-369.
- Ellis R. H. y E. H. Roberts (1980)** Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45: 13-30.
- Fernández F., J. M. Dell'Amico, K. Fernández, I. de la Providencia y A. Morte (2005)** Inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares de *Glomus mosseae* y *Glomus* sp1 en medio líquido. *Cultivos tropicales* 26: 29-36.
- Hernández-Cuevas L. V., P. Guadarrama-Chávez, I. Sánchez-Gallen y J. Ramos-Zapata (2012)** Micorriza arbuscular, colonización intrarradical y extracción de esporas de suelo. *In. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración.* Álvarez S. J. y Monroy A. A. (Comps.). Fac. de Ciencias UNAM. DF, México. 1-16 pp.
- Lekberg Y. y R. T. Koide (2008)** Effect of soil moisture and temperature during fallow on survival of contrasting isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 86: 1117-1124.
- Mohamed-Yasseen Y., S. A. Barringer, W. E. Splittstoesser y S. Costanza (1994)** The role of seed coats in seed viability. *The Botanical Review* 4: 427-435.
- Moreno M. E. (1996)** Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 3^{ra} ed., UNAM, México DF. 393 p.
- Mäder P., S. Edenhofer, T. Boller, A. Wiemken y U. Niggli (2000)** Arbuscular mycorrhizae in long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biology and Fertility of Soils* 31: 150-156.
- Millaleo R., C. Montecinos, R. Rubio, A. Contreras y F. Borie F. (2006)** Efecto de la adición de compost sobre propágulos micorrízicos arbusculares en un suelo volcánico del centro sur de Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 3: 26-39.
- Nagel M. y A. Borner (2009)** The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed science research*. 20: 1-12.
- Navarro M. y Y. González (1999)** Identificación del periodo de latencia en tres especies de

árboles leguminosos. *Pastos y Forrajes*. 22: 239-243.

Statgraphics. (2005) StatGraphics centurion: ver. XV (User manual). StatPoint Technologies Inc. Warrenton, VA, EEUU.

Tommerup C. (1983) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 81(1): 37-45.

Trinidad-Cruz J. R., E. E. Quiñones-Aguilar, L. V. Hernández-Cuevas, L. López-Pérez y G. Rincón-Enríquez (2017) Hongos micorrícicos arbusculares asociados a la rizósfera de *Agave cupreata* Trel. & Berger en regiones mezcaleras del estado de Michoacán, México. *Scientia Fungorum* 45:13-25.

Verma P. y M. Majee (2013) Seed germination and viability test in tetrazolium (TZ) assay. *Bio-protocol* 3: e884.

Verma P., H. Kaur, B. P. Petla, V. Rao, S. C. Saxena y M. Majee (2013) Protein L-isoaspartyl methyltransferase is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins. *Plant Physiology* 161: 1141-1157.

Xiao W., K. D. Custard, R. C. Brown, B. E. Lemmon, J. J. Harada, R. B. Goldberg y R. L. Fischer (2006) DNA methylation is critical for arabidopsis embryogenesis and seed viability. *The plant cell* 18: 805-814.

CAPÍTULO V

Fitorremediación de un jal de mina contaminado con metales pesados con accesiones de girasol ornamental asociado a hongos micorrízicos arbusculares

Phytoremediation of a mine tailing contaminated with heavy metals using ornamental sunflower accessions associated with arbuscular mycorrhizal fungi

Vital-Vilchis I.¹; Quiñones-Aguilar E.E.¹; Hernández-Montiel L.G.²; Moreno-Vilet L.³; E. Hernández-Acosta³; Rincón-Enríquez G.^{1,*}

¹Laboratorio de Fitopatología, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal. Zapopan, Jalisco, C.P. 45019. ²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, BCS, México, C.P. 23096. ³Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230.

RESUMEN

La minería es una de las actividades más importantes en México, ya que contribuye con el 4% del PIB Nacional. Los minerales son extraídos del suelo donde la parte redituable se separa por cianuración y el resto se deposita en pilas llamadas jales que contienen metales pesados peligrosos (como el Pb y Zn) para el medio ambiente y la salud humana. El girasol es una planta capaz de acumular estos metales en sus órganos aéreos para removerlos del jal. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) pueden emplearse para optimizar dicha absorción y acumulación de esos metales. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue evaluar la extracción asistida de *Helianthus annuus* en simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares para remediar un jal contaminado con metales pesados en Pachuca, Hidalgo. Se estableció un experimento en bloques al azar en condiciones de campo con 2 factores: HMA con 3 niveles: *Funneliformis mosseae* (FM), el consorcio Cerro

del Metate (CM) y un control sin micorriza; el factor accesiones de girasol con 6 niveles: Gigante Simple Amarilla (GSA), Belleza de Otoño (BO), colecta 4 (col4), sel25, sel35 y Victoria. Al final del experimento se midió: floración, peso fresco (de raíz y órganos aéreos), altura de planta, diámetro del tallo, número de hojas, colonización micorrízica, esporulación y contenido de Pb y Zn en biomasa. Así como variables físicoquímicas del jal. Los resultados mostraron que GSA es la variedad más grande y que la micorrización no influye sobre las variables de crecimiento vegetal. GSA-FM absorbió 40% más Zn que su control y sel25-CM absorbió 55% más Zn que su control mientras que BO-FM absorbió 84% más de Pb que su control. El lugar del jal analizado posee propiedades físicoquímicas de fertilidad aceptables. El suelo contiene una cantidad de Pb y una cantidad de Zn consideradas dentro de los límites aceptables.

Palabras clave: fitoextracción, fitorremediación asistida, metales pesados, minería, contaminación ambiental.

SUMMARY

Mineral mining is one of the most important economic activities in Mexico, as it contributes with 4% of the national GDP. Minerals are extracted from soil where the profitable part is separated by cyanidation and rest is piled up in what is called mine tailings, which can contain hazardous heavy metals for environmental and human health. Sunflower is a plant capable of accumulating these metals in its aerial organs in order to get them removed from the mine tail. It is possible to use arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to optimize the metal absorption. Due to the anterior, the main objective of this work was to evaluate the assisted extraction of *Helianthus annuus* in symbiosis with AMF to remediate a mine tailing in Pachuca, Hidalgo. A random blocked field conditions experiment was established with 2 factors; AMF with 3 levels: *Funneliformis mosseae* (FM), the consortium Cerro del Metate (CM) and a control with no AMF and the factor sunflower accession with 6 levels: Gigante Simple Amarilla (GSA), Belleza de Otoño (BO), colecta 4 (col4), sel25, sel35 and Victoria. At the end of the experiment, flowering, fresh weight (root and aerial organs), height, stem diameter, leaves number, mycorrhizal

colonization, sporulation and Pb and Zn content in biomass were evaluated. As well as physicochemical properties of the mine tailing. Results showed that GSA is the biggest accession and that mycorrhizal fungi symbiosis does not have a role over plant growth variables. GSA-FM accumulates 40% more Zn than its control and sel25-CM accumulates 55% more Zn than its control, while BO-FM accumulates 84% more Pb than its control (Tukey, $p \leq 0.05$). Physicochemical properties of the given site show acceptable fertility. Mine tailing contains low concentrations of Pb and Zn and therefore are not considered as a contamination hazard.

Key words: phytoextraction, assisted phytoremediation, heavy metals, mining, environmental contamination.

INTRODUCCIÓN

La minería es una actividad económica importante en México ya que contribuye con el 4% del Producto Interno Bruto nacional, ocupando el 1^{er} lugar en la producción de plata a nivel mundial y estando entre los 10 principales productores de 16 minerales como: bismuto, fluorita, celestita, Cadmio, Molibdeno, Plomo, Zinc diatomita, sal, barita, grafito, yeso, oro y cobre (Secretaría de Economía, 2015).

Entre los estados mineros más importantes se encuentran Zacatecas, Sonora, Chihuahua, Durango y otros (INEGI, 2015). Hidalgo también es un estado minero, el distrito minero Real del Monte y Pachuca (en Hidalgo) ha producido a la fecha, en 462 años, 40000 t de plata y 231 t de oro, lo que representa 16% de la producción nacional de plata y 6% de la producción mundial (SGM, 2016).

Anteriormente, los minerales eran separados del resto del suelo por amalgamación (mezcla con mercurio), sin embargo, actualmente se recuperan por cianuración (SGM, 2016). Una vez que el mineral de interés ha sido separado, se colectan los residuos de suelo y roca que se acumulan en lo que es llamado un jal. La composición de los jales de mina es diversa y varía dependiendo del tipo de mineral a extraer y del material que lo acompaña; un jal de Guanajuato mostró estar constituido mayoritariamente por cuarzo, calcita, covelita y en menor proporción por magnetita, fierro y zinc. Los jales muestran una

ausencia total de materia orgánica y valores de pH que van de neutros a alcalinos (Medel-Reyes *et al.*, 2008). Adicionalmente se ha identificado la presencia de elementos potencialmente tóxicos (EPT) como: Fe, Mn, Zn, Pb, Cr, Cd, As, Cu en diferentes jales del país (Medel-Reyes *et al.*, 2008; Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2007; Camarillo-Ravelo *et al.*, 2015; Martín-Romero y Gutiérrez-Ruiz, 2010) aunque también se podrían encontrar Hg y Ag (Rashed, 2010).

Muchas empresas descargan sus jales en ríos o los disponen en grandes pilas (Sánchez, 1995; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005) de forma que son una fuente de contaminación para el suelo, aire y agua ya que en sequía el viento arrastra los jales mineros causando que los elementos traza se dispersen por el ambiente, convirtiéndose en un foco de contaminación (dispersión eólica). Mientras que, en lluvias, la problemática se asocia con la generación de lixiviados ácidos y su dispersión a través de los escurrimientos superficiales (dispersión hídrica) (Romero *et al.*, 2008; Ruiz-Huerta y Armienta-Hernández, 2012; Sommer *et al.*, 2000).

La toxicidad de los metales pesados está relacionada con la generación de radicales libres y la disminución de actividad de las enzimas antioxidantes desencadenando un estrés oxidativo celular (Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011) y en consecuencia problemas de salud; el plomo, por ejemplo, causa síntomas como retraso del crecimiento e impacto al sistema nervioso de los seres humanos (Alvarado *et al.*, 2011).

De acuerdo con la legislación mexicana (PROY-NOM-138-Semarnat-2003) el término remediación de suelos se entiende como el conjunto de acciones necesarias para recuperar y restablecer sus condiciones. Sin embargo, el principal inconveniente para remediar suelos contaminados con metales pesados reside en que dichos metales a diferencia de los contaminantes orgánicos, no se pueden degradar, lo cual los hace persistir en el ecosistema. El plomo, por ejemplo, puede ser retenido en el suelo de 150 a 5000 años (Khalid *et al.*, 2016; Shaw, 1990).

Actualmente, las técnicas para remediar sitios contaminados con metales pesados se dividen en físicas, químicas y biológicas (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005; Khalid *et al.*,

2016). En este contexto, la fitorremediación es una técnica biológica que utiliza plantas para estabilizar (inmovilizar el contaminante para que no sea biodisponible), volatilizar (absorber el contaminante y su liberarlo en su forma volátil) o extraer los metales pesados del suelo (acumular el contaminante en sus órganos aéreos). También se puede remediar con una extracción asistida en la que los microorganismos de la rizosfera facilitan la extracción del metal por la planta (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005; Khalid *et al.*, 2016).

El girasol (*Helianthus annuus*) es un ejemplo de una planta hiperacumuladora que puede extraer Zn, Pb (Adesodun *et al.*, 2010), Cd, Cr, Ni, As, Fe (January *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2003) y hasta incluso U¹³⁷, Cs y Sr⁹⁰ (Prasad y Freitas, 2003; Shahandeh y Hossner, 2002). Mientras que los hongos micorrízicos arbusculares son un ejemplo de microorganismos que pueden ser usados para la extracción asistida (Khan *et al.*, 2000). Se sabe que la colonización en girasol por diferentes *Glomus* incrementa la absorción de Pb (Barcos Arias *et al.*, 2015).

En un jal de Pachuca en específico, se encontró que los mayores contaminantes son el Zn y el Pb (Hernández-Acosta *et al.*, 2009) y el girasol es capaz de absorber y traslocar Pb y Zn a sus órganos aéreos, sobre todo en la etapa temprana de su crecimiento (Kayode Adesodun *et al.*, 2010).

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la extracción asistida de *Helianthus annuus* en simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares para remediar un jal contaminado con metales pesados en Pachuca Hidalgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 4 colectas de *Helianthus annuus* silvestres denominadas como: SEL35 (colectada en Celaya, Guanajuato, 20° 34' 48"N, 100° 49' 12.4'O), SEL25 (colectada en Celaya, Guanajuato, 20° 34' 48"N, 100° 49' 12.4'O), Victoria (colectada en Durango, Durango, 24° 4' 43.81"N, 104° 36' 0.87'O) y colecta 4 (colectada en Villa Zaragoza, San Luis Potosí, 22° 2' 23'O, 100°43'47') proporcionadas por el Banco Nacional de

Germoplasma Vegetal (BANGEV, México) además de las variedades ornamentales Girasol Gigante Simple Amarillo (Hortaflor®, Rancho Los Molinos, Mor, Mex) y Girasol Belleza de Otoño (Vita®, Rancho Los Molinos, Mor, Mex).

Todas las semillas fueron colocadas en sanitas de papel humedecidas con agua corriente con la técnica “tacos de germinación” recomendado por Moreno (1996). Los tacos permanecieron en condiciones de oscuridad a 25°C por 5 días para después ser trasplantadas. Los inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) empleados fueron una monocepa de *Funneliformis mossea* y un consorcio denominado como Cerro del Metate (CM) aislado de rizosfera de agave (Trinidad *et al.*, 2017). Dichos inóculos fueron previamente propagados durante 8 meses bajo invernadero en macetas trampas empleando sorgo (*Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanese* Sweet Chow; Western Seed Co.) como hospedero.

Los distintos materiales de girasol fueron inoculados al momento de trasplantar en las bolsas de polietileno, el inóculo (compuesto de 80 esporas viables) se colocó directamente sobre la raíz. El sustrato empleado en el experimento fue una mezcla peat moss, humus de lombriz y suelo (70:10:20 (v/v/v)) estéril (120°C, 1.05 kg cm⁻², 6 h). Se emplearon bolsas de polietileno negro con 350 g de la mezcla. 20 días después de la inoculación con los HMA, las plantas fueron trasplantadas en un jal que contenía residuos mineros bajo condiciones de cielo abierto en la ciudad de Pachuca Hidalgo donde permanecieron 40 días.

Condiciones del experimento

El experimento de fitorremediación se realizó en condiciones de campo como se muestra en la **Figura 19** en el jal de residuos mineros “jal histórico CEUNI” (García-Roa *et al.*, 2018) en Pachuca Hidalgo ubicado en las coordenadas geográficas 20° 10' 73.11" latitud N y 98° 70' 73.11" longitud O del 28 de junio al 8 de agosto del 2018.



Figura 19. Plantas de girasol establecidas en un jal que contiene metales pesados en Pachuca, Hidalgo durante la época de verano (Julio 2018) a los 20 días después del trasplante en bolsa.

Diseño experimental, de tratamientos y variables de respuesta evaluadas

Se utilizó un diseño experimental en bloques al azar de efectos fijos bajo un diseño de tratamientos bifactorial 6×3 (18 tratamientos) (**Cuadro 15**). El factor variedad tuvo 6 niveles que correspondieron a los 6 genotipos de girasol seleccionados y el factor micorriza tuvo 3 niveles que correspondieron a dos inóculos seleccionados de HMA más un control sin micorriza. Cada tratamiento tuvo 8 repeticiones. La unidad experimental consistió en una planta con su respectivo inóculo.

Cuadro 15. Diseño de tratamientos en un experimento de fitoremediación empleando plantas de girasol micorrizadas

Tratamiento	Factor material de girasol	Factor inóculo de HMA
BO-CM		Cerro del Metate (CM)
BO-FM	Belleza de Otoño	Funneliformis mosseae (FM)
BO-sinHMA		Sin HMA
GSA-CM		Cerro del Metate (CM)
GSA-FM	Gigante Simple Amarillo	Funneliformis mosseae (FM)
GSA-sinHMA		Sin HMA
SEL35-CM		Cerro del Metate (CM)
SEL35-FM	SEL35	Funneliformis mosseae (FM)
SEL35-sinHMA		Sin HMA
SEL25-CM		Cerro del Metate (CM)
SEL25-FM	SEL25	Funneliformis mosseae (FM)
SEL25-sinHMA		Sin HMA
Victoria-CM		Cerro del Metate (CM)
Victoria-FM	Victoria	Funneliformis mosseae (FM)
Victoria-sinHMA		Sin HMA
colecta4-CM		Cerro del Metate (CM)
colecta4-FM	colecta4	Funneliformis mosseae (FM)
colecta4-sinHMA		Sin HMA

Al final del experimento (60 días de inoculación micorrízica y 40 días de exposición a los contaminantes mineros) se midieron las siguientes variables de respuesta (**Cuadro 16**).

Cuadro 16. Variables de respuesta evaluadas sobre la materia vegetal después de 40 días de exposición a los contaminantes mineros.

Variable de respuesta	Descripción
Altura de la planta (cm)	Medida con un flexómetro (Truper®) desde la base hasta el ápice sin tomar en cuenta el capítulo floral.
Número de hojas	Se contabilizaron de forma manual todas las hojas completamente desarrolladas que no mostraron síntomas de marchitas y que midieran más de 2 cm.
Diámetro del tallo (mm)	Medido con un Vernier electrónico (Surtek®) en la base del tallo.

Continuación del cuadro 16.

Floración	<p>Al final del experimento (60 días de inoculación micorrízica y 40 días de exposición a los contaminantes mineros) se midieron las variables de respuesta siguientes:</p> <p>Se hizo una escala cualitativa para evaluar la floración de cada planta:</p> <ul style="list-style-type: none">0→ápice no diferenciado1→ápice diferenciado2→botón floral formado3→el botón se encontró abierto y se notaron pétalos en la inflorescencia4→capítulo completamente abierto
Colonización micorrízica (%)	<p>Para la colonización micorrízica se siguió la técnica de tinción y clareo de Phillips y Hayman (1970); para la cuantificación de la colonización se empleó el método de Hernández-Cuevas <i>et al.</i> (2012) (Figura 20).</p>
Peso seco (g)	<p>La biomasa recién cosechada se puso en un horno de secado a 110 °C por 5 días. Después de ese tiempo la materia seca se pesó en una balanza granataria.</p>
Metales pesados (Zn y Pb) (mg/kg)	<p>La biomasa se digirió con una mezcla diácida (8:2) (ácido sulfúrico y ácido perclórico) por 24 horas (Figura 21). Después se calentó con 1 mL de peróxido de hidrógeno hasta clarear. Los metales fueron cuantificados por espectrofotometría de absorción atómica (Marca GBC, Modelo Avanta) según la norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.</p>
Factor de traslocación	<p>Para calcular la porción de metal pesado que se absorbió por las raíces y posteriormente se acumuló en los órganos aéreos se calculó el factor de traslocación calculado como: división de la concentración de los metales en el tejido aéreo entre la concentración de los metales en el tejido subterráneo. (Madera-Parra, 2014).</p> $FT = \frac{Ca}{Cu}$

Los resultados de las distintas variables de respuesta fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) excepto para floración en la que se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con el programa Statgraphics Centurion (StatPoint Inc., 2005).

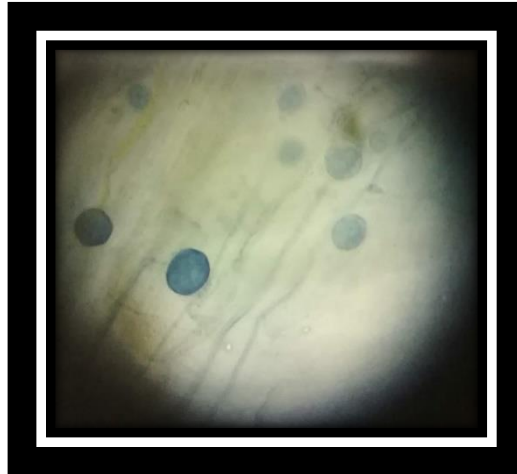


Figura 20. Detalles de una raíz de girasol colonizada con hongo micorrízico arbuscular provenientes de un jal de mina de Pachuca Hidalgo.



Figura 21. Digestión diácida de la biomasa seca de tejido de girasol para cuantificar metales pesados.

Evaluación de las propiedades fisicoquímicas del jal

Al final del experimento (40 días de fitorremediación) se tomaron muestras de la rizósfera de cada uno de los 18 tratamientos para la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, además se agregó un control que consistió en una muestra de jal sin tratamiento (sin planta y sin HMA). Para dichas muestras se determinaron las características siguientes (**Cuadro 17**)

Cuadro 17. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de jal recolectado de la rizósfera de los tratamientos (después de 40 días de experimentación) y de una porción de jal sin tratamiento en un experimento de fitorremediación según la norma mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 Pachuca, Hidalgo.

Variable de respuesta	Descripción
pH	Se mezcló suelo y agua (1:2) y se agitó a 180 rpm por 30 minutos. Pasado este tiempo se midió con potenciómetro.
Materia orgánica (%)	Se determinó a través del contenido de carbono orgánico con el método de Walkley y Black (Figura 22). El método se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido fosfórico. Se adiciona ácido fosfórico para evitar interferencias de Fe ³⁺ . El dicromato de potasio residual es valorado con sulfato ferroso.
Conductividad eléctrica (dS/m)	Se relaciona con la respuesta de los cultivos a la salinidad. Se agregaron 70 mL de agua a 20 g de suelo y después de reposar 24 h se determinaron los valores con un conductímetro.
Fósforo inorgánico (mg/g)	Se cuantificó por el método de Olsen (para suelos neutros o alcalinos) (Figura 23) para cuantificar fósforo disponible. 2.5 g de suelo se mezclaron con 30 mL de solución extractora de Olsen y se agitó por 30 min a 180 rpm. Se filtró y se recuperó el sobrenadante. A 5 mL del filtrado se le agregaron 5 mL de la solución reductora (ácido ascórbico con molibdato de amonio) y la mezcla se aforó hasta 50 mL. Después de 30 min, las muestras presentaron un cambio de color y fueron analizadas mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 82 nm. Para calcular la concentración de fósforo se hicieron regresiones lineales con respecto a una curva de calibración.
Metales pesados (Zn y Pb) (mg/kg)	Para la extracción de metales pesados se mezclaron 10g de suelo con 20ml de solución de DTPA (0.005M). La mezcla se agitó por 2hr a 180rpm y fue filtrada para recuperar el sobrenadante. La concentración se midió por espectrofotometría de absorción atómica (Marca GBC, Modelo Avanta) según la norma oficial mexicana.
Densidad aparente (g/ml)	En una probeta se midieron 100 mL de suelo y se pesaron. Después la probeta se golpeó 30 veces contra la mesa y se registró el nuevo volumen.
Densidad real (g/ml)	La masa se midió pesándola y el volumen se midió por desplazamiento del agua. (Figura 24).

Continuación del cuadro 17.

Número de esporas de HMA	Se realizó la extracción de esporas por agitación mecánica y tamizado de acuerdo con el método propuesto por Hernández-Cuevas <i>et al.</i> (2012).
--------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



Figura 22. Método colorimétrico de Walkley y Black para determinar el contenido de materia orgánica en suelo. La muestra vira de negro (derecha) a verde bandera (izquierda) después de la titulación.



Figura 23. Método colorimétrico de Olsen para cuantificar fósforo inorgánico disponible en suelo. La muestra vira de amarillo a azul intenso en presencia de fósforo.



Figura 24. Densidad real de una muestra de suelo. El volumen se mide por desplazamiento de agua.

RESULTADOS

La floración es dependiente del material genético de girasol

El estado de floración está fuertemente asociado con el material genético de girasol (**figura 25**), siendo Victoria la accesión que floreció primero seguida de las variedades ornamentales Belleza de Otoño y Gigante Simple Amarilla. Las accesiones silvestres colecta 4, Sel25 y sel35 no florecieron durante el experimento (60 días después del trasplante a maceta). Por otro lado, para el factor HMA no se encontraron diferencias significativas para la escala de floración (**Figura 26**) es decir, la floración no está influenciada por los hongos micorrízicos arbusculares. Los resultados fueron comprobados por la prueba Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$)

El ciclo ontogénico de colecta4, sel25 y sel 35 es más largo que el de las demás variedades ornamentales y no alcanzaron a florecer durante el experimento.

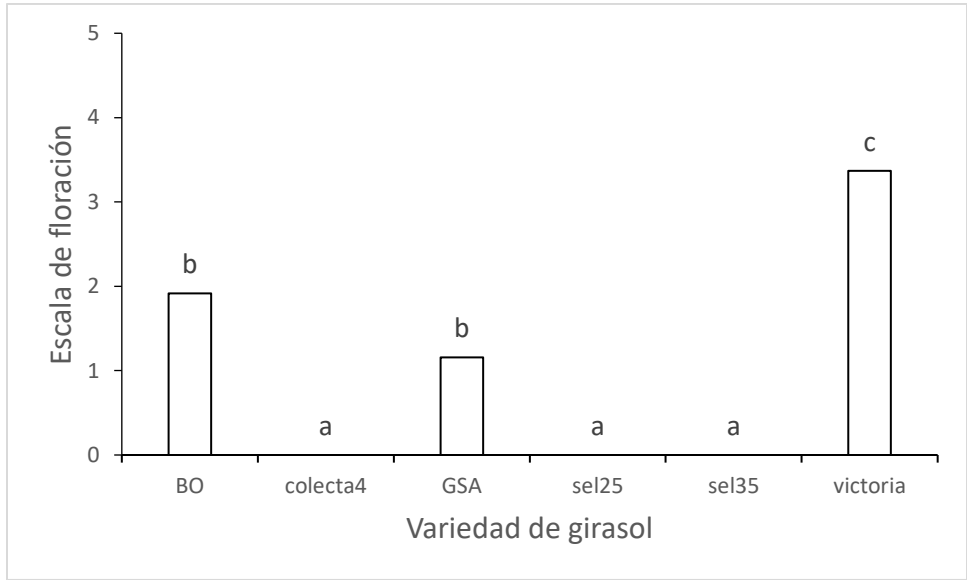


Figura 25. Estado de la floración, con respecto a la variedad ornamental de girasol, a los 60 días de haber inoculado las plantas con HMA donde 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se pueden observar los granos formados, GSA= Gigante Simple amarillo y BO= Belleza de Otoño. Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$).

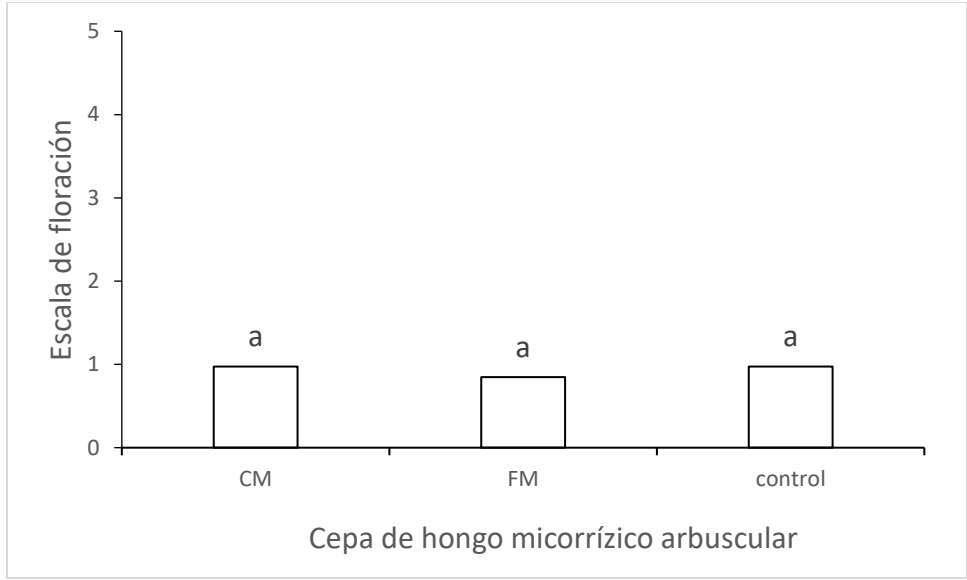


Figura 26. Estado de la floración, con respecto a la variedad ornamental de girasol, a los 60 días de haber inoculado las plantas con HMA donde 0= ápice no diferenciado, 1= ápice diferenciado, 2=botón floral formado, 3= botón abriéndose, 4= capítulo totalmente abierto, 5= se ven los granos en el capítulo, GSA= Gigante Simple amarillo y BO= Belleza de Otoño. Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$).

El crecimiento del girasol micorrizado es influenciado por la variedad.

Existen diferencias significativas para todas las variables de crecimiento entre los

tratamientos de acuerdo con (Tukey, $p \leq 0.05$) a los 60 días después de la inoculación (de los cuales solamente se expuso al jal contaminado por metales pesados durante 40 días) (**Cuadro 18**). En términos generales, La variedad GSA es la que tuvo mayor respuesta (mayor número de hojas, altura y peso seco.) (**Cuadro 18, Cuadro 19, Figura 31**). En general, la colonización de las plantas inóculadas se encontró entre el 22% y el 50% mientras que las plantas control (sin inoculación) se encontraron entre el 11% y el 23% (**Figura 27, Cuadro 18**). No hubo diferencias significativas (Tukey, 0.05) en las variables de crecimiento entre los tratamientos inculados y los controles. El tratamiento con mayor esporulación fue BO inculado con CM.



Figura 27. Planta de Girasol Gigante Simple Amarillo colonizado por HMA nativos del jal de mina histórico CEUNI en un experimento de fitorremediación en condiciones de cielo abierto en Pachuca, Hidalgo.

Cuadro 18. Crecimiento vegetal de los distintos tratamientos 60 días después de la inoculación con HMA (40 días del trasplante en un jal minero) en tiempos de lluvia, Pachuca, Hidalgo. CM= Cerro del Metate, FM= *Funneliformis mosseae*, HMA= hongo micorrízico arbuscular, BO= Belleza de Otoño, GSA= Gigante Simple Amarilla.

Tratamiento		Número de hojas	Diámetro de tallo(mm)	Altura de planta (cm)	Densidad de esporas (en 100 /g)	Colonización%
BO	CM	22 bcd	7.42 ab	64.25 ab	124 d	29.9 ab
	FM	20.4 abcd	6.84 ab	71.6 abc	37 ab	22 ab
	Sin HMA	18.67 abcd	5.65 ab	68.33 abc	45 abc	13.3 ab
colecta4	CM	19.44 abcd	7.52 ab	69.96 ab	70 abcd	40.3 ab
	FM	19.5 abcd	8.53 b	81.38 bcde	99 cd	51.3 b
	Sin HMA	18.4 abcd	8.59 b	78.2 abcde	94 cd	13.8 a
GSA	CM	25.33 cd	7.32 ab	104.75 f	78 abcd	23.3 ab
	FM	24.6 d	7.05 ab	95.2 def	65 abcd	37.3 ab
	Sin HMA	23.8 cd	7.69 ab	99.83 ef	87 cd	19.6 ab
sel25	CM	18.8 abcd	7.77 ab	66.6 ab	100 d	22.3 ab
	FM	19.5 abcd	7.75 ab	76.38 abcd	70 abcd	28 ab
	Sin HMA	21.43 bcd	8.18 b	71.57 abc	80 bcd	23.1 ab
sel35	CM	19 abcd	8.01 ab	74.5 abcd	111 d	26.5 ab
	FM	17.75 abc	7.47 ab	62.33 a	33 a	30.7 ab
	Sin HMA	19.1 abcd	7.52 ab	71.4 abc	68 abcd	11.3 a
Victoria	CM	16 ab	6.21 ab	90.17 cdef	73 abcd	36.1 ab
	FM	14.75 ab	6.88 ab	87 bcdef	76 bcd	43.2 ab
	Sin HMA	14.29 a	5.78 a	86 bcdef	97 cd	13.5 a

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuadro 19. Acumulación de biomasa seca vegetal de los distintos tratamientos 60 días después de la inoculación con HMA (40 días del trasplante en un jal minero) en tiempos de lluvia, Pachuca, Hidalgo. CM= Cerro del Metate, FM= *Funneliformis mosseae*, HMA= hongo micorrízico arbuscular, BO= Belleza de Otoño, GSA= Gigante Simple Amarilla.

Tratamiento		Peso seco (g)		
		Raíz	Follaje	Total
BO	CM	2.2 a	8.7 ab	10.9 ab
	FM	2.2 a	6.8 ab	8.2 ab
	Sin HMA	0.8 a	5.2 ab	6.0 ab
colecta4	CM	1.7 a	6.9 ab	8.6 ab
	FM	1.3 a	6.2 ab	7.4 ab
	Sin HMA	1.7 a	8.1 ab	9.8 ab
GSA	CM	1.9 a	12.2 b	14.8 b
	FM	1.6 a	8.4 ab	10.0 ab
	Sin HMA	2.1 a	11.9 b	15.2 b
sel25	CM	1.8 a	7.3 ab	9.1 ab
	FM	1.3 a	6.3 ab	7.6 ab
	Sin HMA	1.7 a	5.6 ab	7.3 ab
sel35	CM	1.7 a	6.4 ab	8.1 ab
	FM	1.4 a	5.3 a	6.6 a
	Sin HMA	2.4 a	10.1 b	12.5 ab
Victoria	CM	1.4 a	6.2 ab	7.6 ab
	FM	1.2 a	5.8 ab	7.1 ab
	Sin HMA	0.8 a	4.8 a	5.7 a

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey ($p \leq 0.05$). En negritas y en azul se muestra el tratamiento con mayor valor para cada variable de respuesta.

Absorción de metales pesados

El tratamiento con mayor absorción de Pb fue Belleza de Otoño inoculada con *Funneliformis mosseae* (3.21 mg/kg) (**Figura 29, Cuadro 20**) mientras que el tratamiento que absorbió más Zn fue Victoria control (2.23 mg/kg) (**Figura 30, Cuadro 20**). El factor de traslocación nos indica, para ambos metales, que existe una mayor cantidad de metal en la raíz ($FT < 1$) y en algunos casos la cantidad de metal en el follaje y la cantidad en la raíz es semejante ($FT = 1$).

Cuadro 20. Acumulación de metales pesados en diferentes variedades de girasol ornamental micorrizado en un experimento de fitorremediación en el jal histórico CEUNI (época de lluvias Pachuca, Hidalgo).

Tratamiento	Pb (mg/kg)			Zn (mg/kg)			FT (Zn)	FT (Pb)	
	Raíz	Follaje	Total	Raíz	Follaje	Total			
BO	CM	1.29 ab	1.04 ab	2.33 abcd	0.9 a	0.62 abc	1.51 abc	0.70 ab	0.899 a
	FM	1.49 b	1.72 b	3.21 d	0.78 a	0.75 c	1.53 bc	1.02 b	1.2018 a
	Sin HMA	1 ab	0.99 ab	1.96 abcd	0.63 a	0.5 abc	1.13 ab	0.84 ab	0.999 a
colecta4	CM	1.02 ab	1.41 ab	2.43 bcd	1.06 ab	0.55 abc	1.61 bc	0.42 a	1.462 ab
	FM	1.13 ab	1.06 ab	2.19 abcd	0.97 ab	0.59 abc	1.54 bc	0.55 ab	1.0165 a
	Sin HMA	1.16 ab	1.02 ab	2.18 abcd	0.64 a	0.69 bc	1.29 ab	1.01 ab	0.6719 a
GSA	CM	1.24 ab	1.47 ab	2.71 cd	0.79 a	0.5 abc	1.29 ab	0.67 ab	1.20 a
	FM	1.03 ab	0.7 a	1.73 abcd	0.88 a	0.6 abc	1.48 abc	0.77 ab	0.5235 a
	Sin HMA	0.98 ab	1.34 ab	2.32 abcd	0.6 a	0.45 ab	1.05 ab	0.76 ab	1.380 a
sel25	CM	0.46 a	0.8 ab	1.25 abc	0.78 a	0.59 abc	1.37 ab	0.75 ab	2.6109 b
	FM	0.54 a	0.56 a	1.1 ab	0.55 a	0.5 abc	1.05 ab	0.91 ab	1.088 a
	Sin HMA	0.67 ab	0.58 a	1.25 abc	0.5 a	0.38 a	0.88 a	0.74 ab	0.9989 a
sel35	CM	0.83 ab	0.64 a	1.47 abc	0.93 a	0.6 abc	1.53 bc	0.70 ab	0.7396 a
	FM	0.54 a	0.71 a	1.25 abc	0.91 a	0.62 abc	1.52 bc	0.71 ab	1.306 a
	Sin HMA	0.45 a	0.49 a	0.94 a	0.77 a	0.74 c	1.49 abc	0.81 ab	0.7582 a
Victoria	CM	1.22 ab	1.17 ab	2.38 abcd	0.76 a	0.48 abc	1.24 ab	0.68 ab	1.045 a
	FM	1.26 ab	1.11 ab	2.38 abcd	0.82 a	0.63 abc	1.31 ab	1.04 b	0.9196 a
	Sin HMA	1.12 ab	1.34 ab	2.46 bcd	1.66 b	0.53 abc	2.23 c	0.55 ab	1.173 a

Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con Tukey ($p \leq 0.05$). En negritas y en azul se muestra el tratamiento con mayor valor para cada variable de respuesta. FT= Factor de Traslocación.

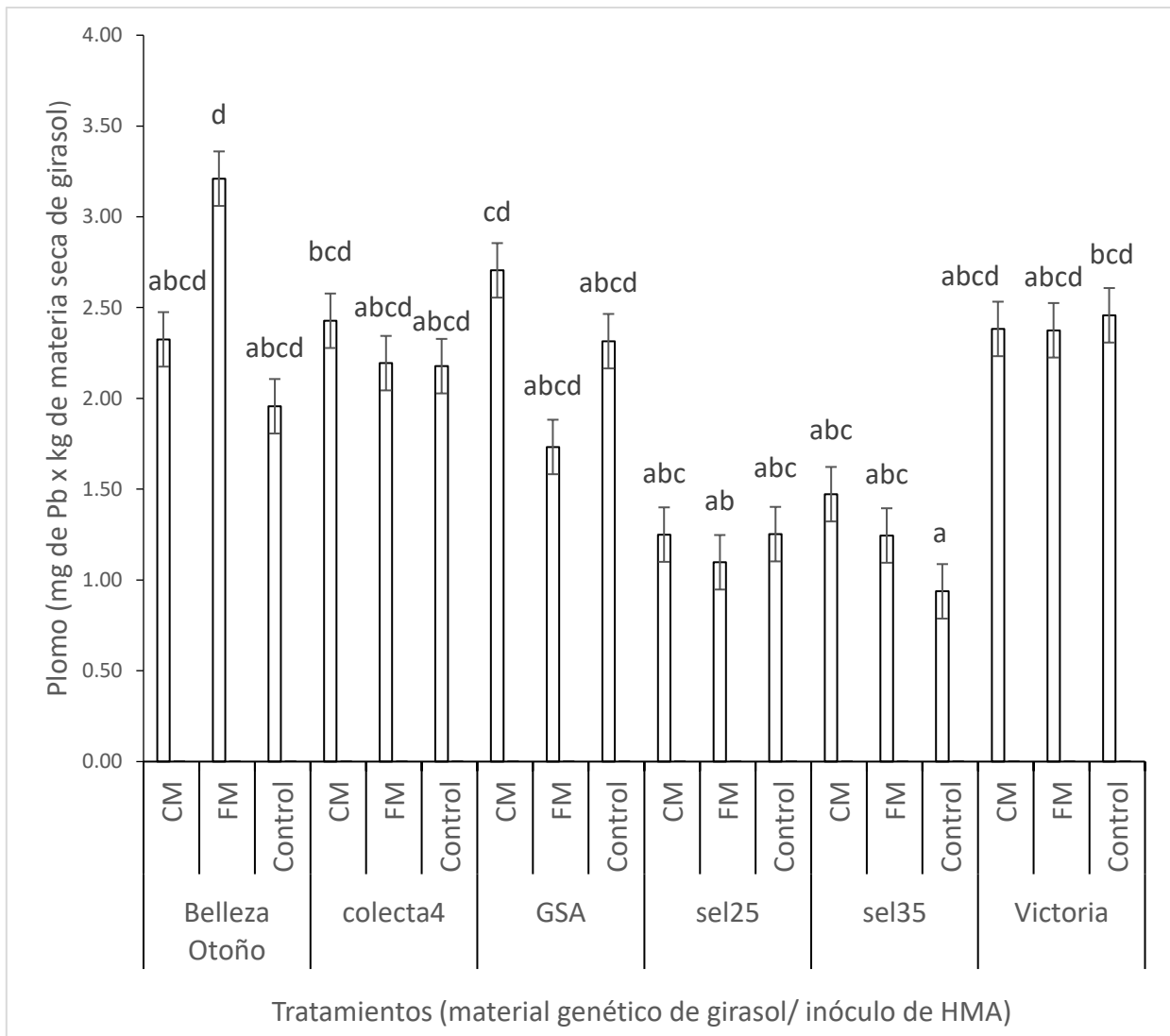


Figura 28. Extracción de plomo (Pb) por distintos materiales genéticos de girasol asociados con hongos micorrizicos arbusculares (HMA) en el jal histórico CEUNI ubicado en Pachuca Hidalgo en un experimento de fitorremediación en época de lluvias (28 de junio al 8 de agosto 2018). CM= Cerro del Metate, FM= *Funneliformis mosseae*, GSA= Gigante Simple Amarilla. Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0.05$).

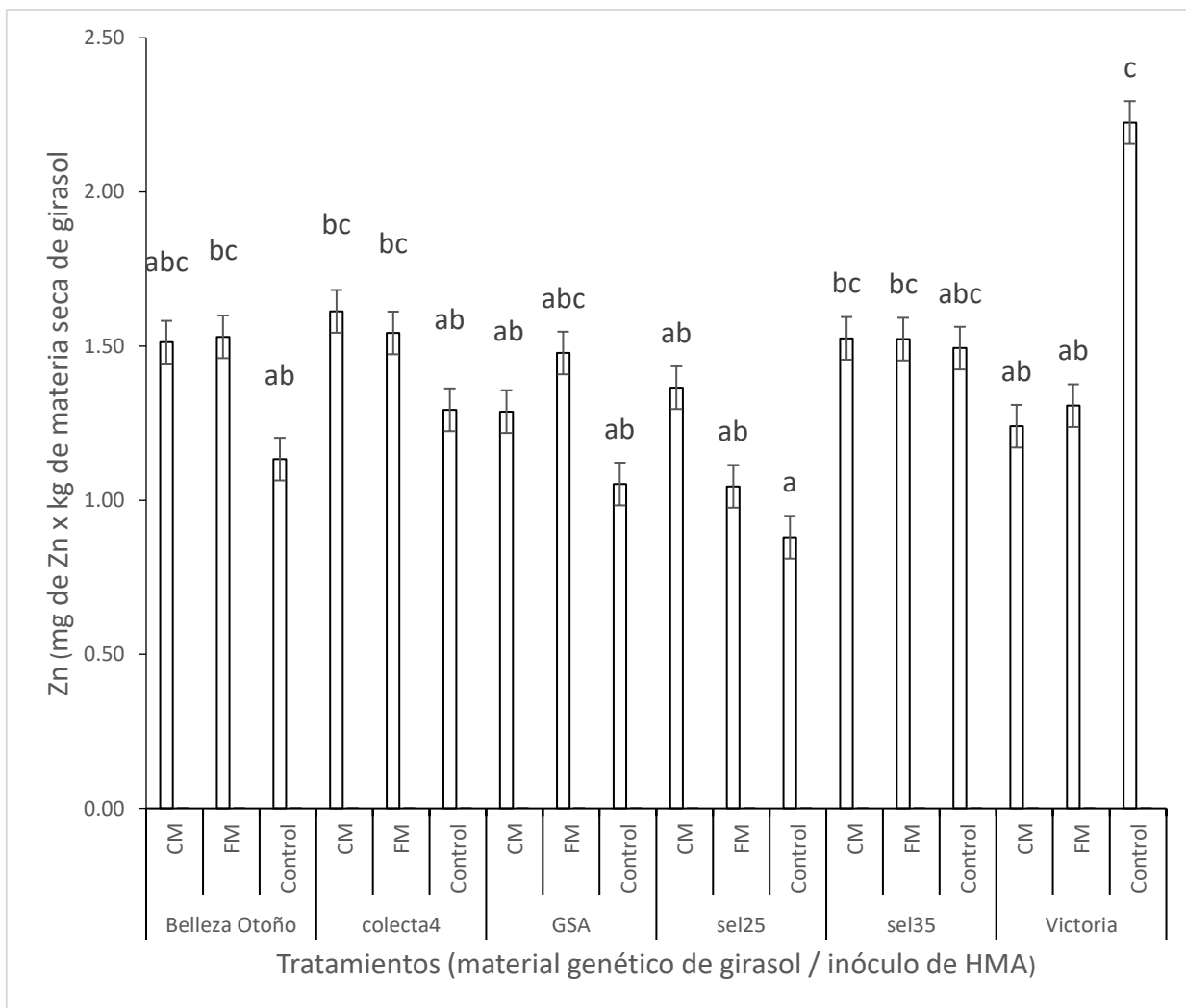


Figura 29. Extracción de zinc (Zn) por distintos materiales genéticos de girasol asociados con hongos micorrizicos arbusculares (HMA) en el jal histórico CEUNI ubicado en Pachuca Hidalgo en un experimento de fitorremediación en época de lluvias (28 de junio al 8 de agosto). CM= Cerro del Metate, FM= *Funneliformis mosseae*, GSA= Gigante Simple Amarilla. Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0.05$).

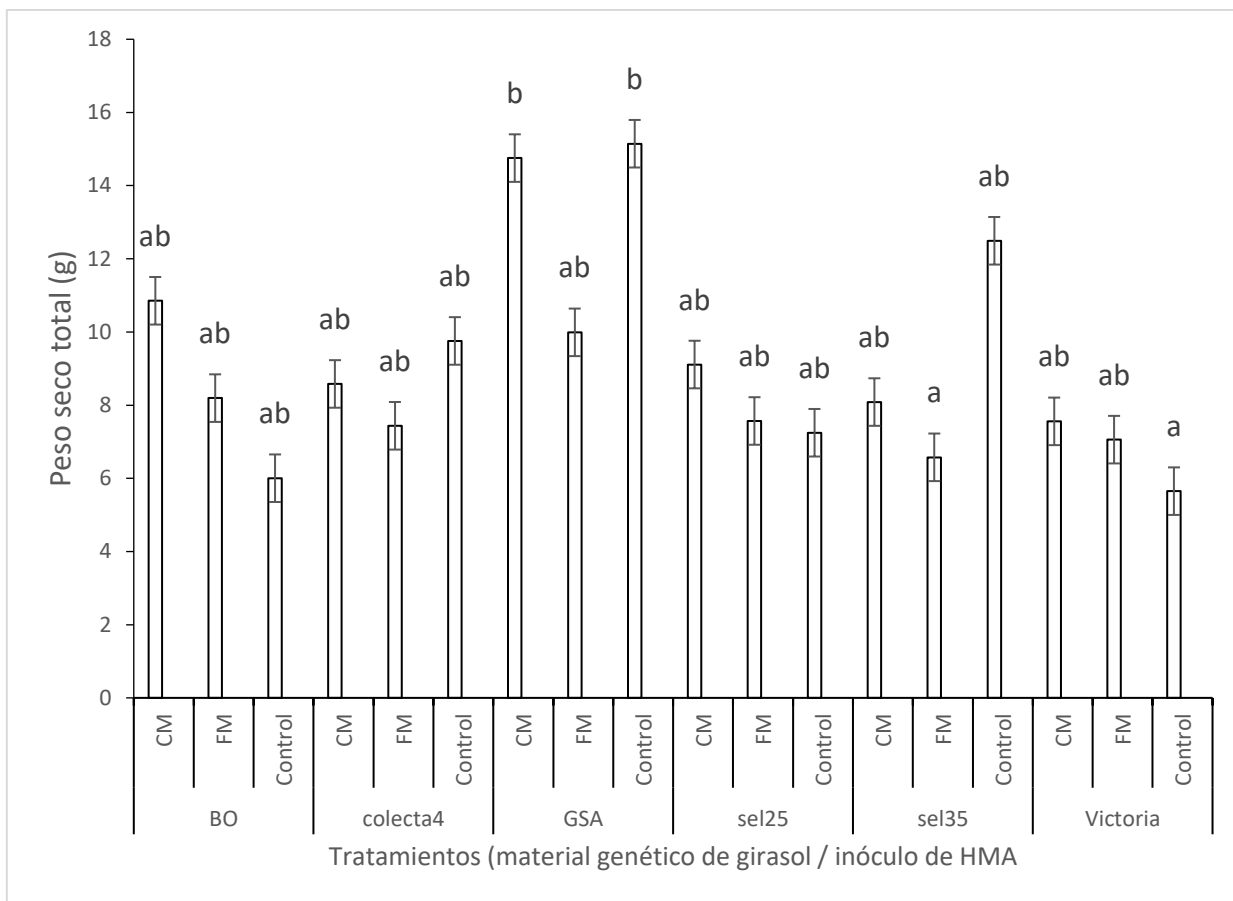


Figura 30. Comportamiento de los pesos secos de distintos materiales genéticos de girasol asociados con hongos micorrizicos arbusculares (HMA) en el jal histórico CEUNI ubicado en Pachuca Hidalgo en un experimento de fitorremediación en época de lluvias (28 de junio al 8 de agosto) CM= Cerro del Metate, FM= *Funneliformis mosseae*, GSA= Gigante Simple Amarilla. Letras distintas indican diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0.05$)

Existe interacción entre la cepa de HMA y la variedad de girasol para la cantidad de esporas y para la absorción de zinc.

Gigante Simple Amarilla es la variedad más grande sin importar el inóculo, los HMA no tienen influencia sobre el crecimiento y no existe interacción entre el inóculo y la variedad para ninguna variable de crecimiento (los inóculos se comportan de la misma manera sobre cada variedad) (**Cuadro 21, Cuadro 22**).

Cerro del Metate fue el inóculo que estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$) esporuló más (en promedio 97.98 esporas/ en 100 g) que los demás y *Funneliformis mosseae* fue aquel que esporuló menos (En promedio 60.52 esporas/en 100 g) sin embargo, la esporulación

depende de la interacción entre variedad de girasol y el inóculo. Registrándose CM con mayor capacidad de esporulación en combinación con la variedad BO (124 esporas/ en 100 g) y FM en col4 (99 esporas/en 100 g) (**Cuadro 21, Figura 31**).

Cuadro 21. Efecto de inóculos de HMA y variedades ornamentales de girasol en el crecimiento vegetal a los 60 días después de inoculación con HMA y 40 días después del trasplante en un jal minero en Pachuca, Hidalgo.

Micorríza	Num. Hojas	Diámetro(mm)	Altura	Esporas/g	% colonización
CM	20.16 a	7.14 a	76.55 a	90.39 b	29.71% b
FM	19.56 a	7.21 a	77.96 a	58.78 a	33.82% b
Sin HMA	19.75 a	7.27 a	78.85 a	76.1 ab	15.78% a

Variedad	Num. Hojas	Diámetro(mm)	Altura (cm)	Esporas/g	% colonización
BO	20.61 b	6.34 ab	67.08 a	58.85 a	21.72% a
colecta4	19.37 b	8.18 c	75.84 a	86.44 b	31.96% a
GSA	24.69 c	7.34 bc	98.52 c	75.94 ab	26.73% a
sel25	20.11 b	7.78 c	71.25 a	82.53 ab	24.47% a
sel35	18.94 b	7.47 bc	67.27 a	63.07 ab	22.84% a
Victoria	15.2 a	6.1 a	86.76 b	81.3 ab	30.93% a

Interacciones					
F†	0.55	0.96	1.75	2.58	1.1
p††	0.85	0.48	0.08	0.0181	0.3776

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). †Valor de F asociado a la Ho: No existe interacción entre el HMA y la variedad de girasol; en negritas se rechaza Ho a un nivel de significancia de 0.05. ††Probabilidad observada del estadístico F.

Cuadro 22. Efecto de inóculos de HMA y variedades ornamentales de girasol en la generación de biomasa seca a los 60 días después de inoculación con HMA y 40 días después del trasplante en un jal minero en Pachuca, Hidalgo.

	Peso seco		
Micorriza	Raíz	Órganos	total
CM	1.78 a	7.94 a	9.82 a
FM	1.35 a	6.47 a	7.8 a
Sin HMA	1.58 a	7.61 a	9.38 a
Variedad	Raíz	Órganos	total
BO	1.46 a	6.89 a	8.35 a
colecta4	1.55 a	7.04 a	8.59 a
GSA	1.85 a	10.8 b	13.3 b
sel25	1.58 a	6.39 a	7.97 a
sel35	1.84 a	7.27 a	9.05 a
Victoria	1.14 a	5.61 a	6.76 a
Interacciones			
F †	1.02	1.3	1.29
p††	0.441	0.25	0.25

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). †Valor de F asociado a la H_0 : No existe interacción entre el HMA y la variedad de girasol; en negritas se rechaza H_0 a un nivel de significancia de 0.05. ††Probabilidad observada del estadístico F.

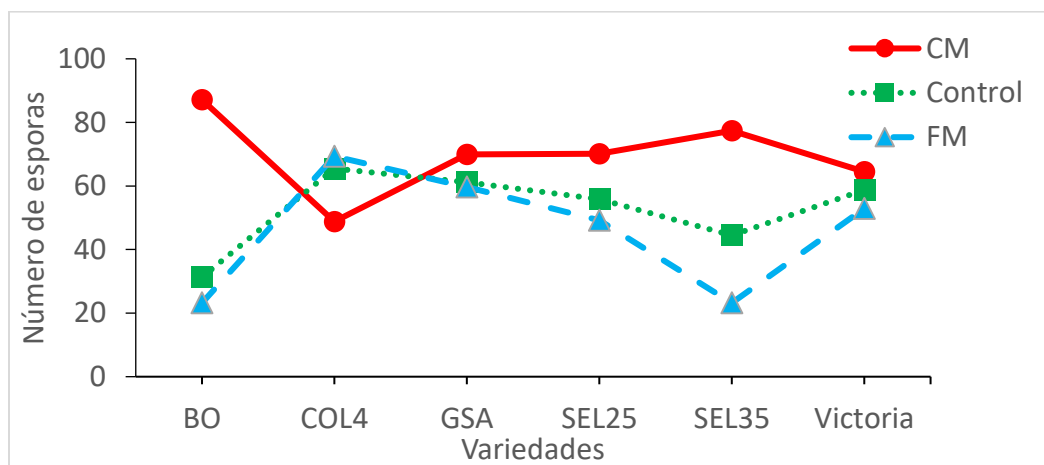


Figura 31. Interacción entre el factor número de esporas de cada inóculo de HMA y el factor variedad de girasol a los 40 días después de iniciado el experimento de fitorremediación (28 de junio al 8 de agosto 2018; Pachuca, Hidalgo).

Las variedades de girasol siguen el orden BO=colecta4=GSA=Victoria> sel25=sel35 para absorción de Pb mientras que para la absorción de Zn siguen el orden de sel35=victoria=colecta>GSA=BO>sel25. Sin embargo, existe interacción entre la variedad y el inóculo (cada inóculo se comporta diferente dependiendo de la variedad) para la

absorción de Zn (**Cuadro 23, Figura 32**) y para el factor de traslocación tanto de Zn como de Pb., *Funneliformis mosseae* ayuda a traslocar Zn mientras que Cerro del Metate ayuda a traslocar Pb. (**Figura 33, Figura 34**).

Victoria-control fue el tratamiento que más zinc absorbió de todos. Por otro lado, a presencia de colonización por HMA (CM y FM) estimuló la absorción de Zn en todas las demás variedades (**Figura 32**). GSA y sel25 muestran esta diferencia en donde el tratamiento GSA-FM absorbió 40% más que su control y sel25-CM absorbió 55% más que su control (**Cuadro 24**). BO con *Funneliformis mosseae* aumentó la absorción de plomo un 84% (**Cuadro 25**).

A pesar de lo anterior En total, la planta que más absorbió Zn y Pb fue Gigante Simple Amarilla colonizada por Cerro del Metate. (**Cuadro 27**)

Cuadro 23. Absorción de Pb y Zn por diferentes variedades de girasol colonizadas con HMA en un experimento de fitorremediación en Pachuca, Hidalgo.

	Micorriza	Pb(mg/kg)	Zn (mg/kg)	FT (Zn)	FT (Pb)
C	CM	1.05 a	0.71 a	0.65 a	1.327 b
	FM	0.99 a	0.71 a	0.83 b	1 a
	Control	0.92 a	0.66 a	0.79 ab	0.99 a
A	Variedad				
	BO	1.27 b	0.7 ab	0.85 a	1.033 ab
	colecta4	1.13 b	0.76 b	0.66 a	1.05 ab
	GSA	1.13 b	0.64 ab	0.73 a	1.037 ab
	sel25	0.6 a	0.55 a	0.8 a	1.566 b
	sel35	0.61 a	0.76 b	0.74 a	0.9347 a
	Victoria	1.2 b	0.77 b	0.76 a	1.0459 ab
B	Parte vegetal				
	Raíz	0.97 a	0.82 b	NA	NA
	Organos	1.01 a	0.57 a	NA	NA
AB	Interacciones				
	F†	0.08	2.23	NA	NA
	P††	1	0.06	NA	NA
BC	F†	0.29	0.93	NA	NA
	P††	0.75	0.4	NA	NA
AC	F†	1.91	2.6	0.0122	4.31
	P††	0.05	0.01	0.0133	0.0002

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). †Valor de F asociado a la Ho: No existe interacción entre el HMA y la variedad de girasol; en negritas se rechaza Ho a un nivel de significancia de 0.05. ††Probabilidad observada del estadístico F. FT= Factor de traslocación.

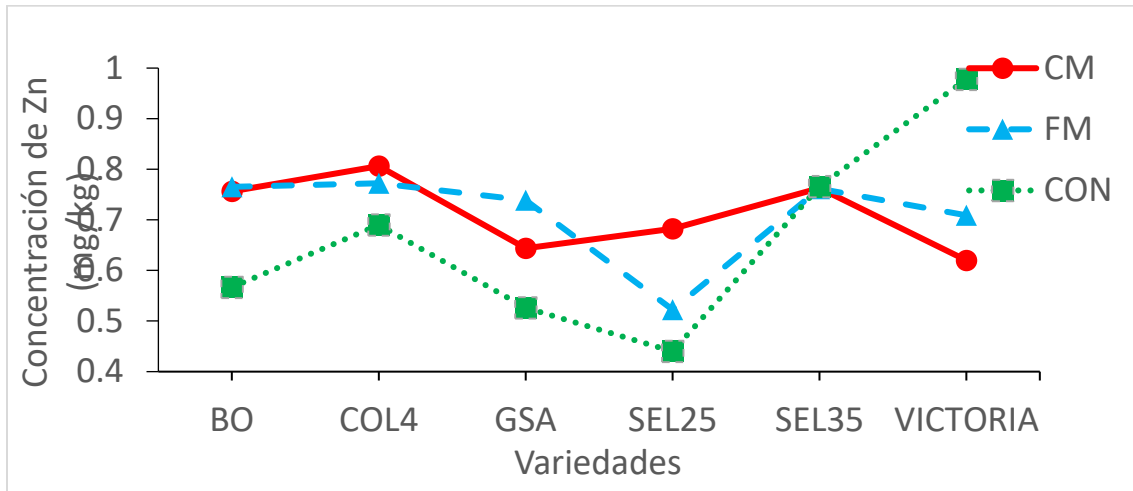


Figura 32. Interacción entre el factor concentración de Zn en biomasa (mg de Zn sobre Kg de biomasa) acumulado por cada inóculo de HMA y el factor variedad de girasol a los 40 días después de iniciado el experimento de fitorremediación (28 de junio al 8 de agosto 2018; Pachuca, Hidalgo).

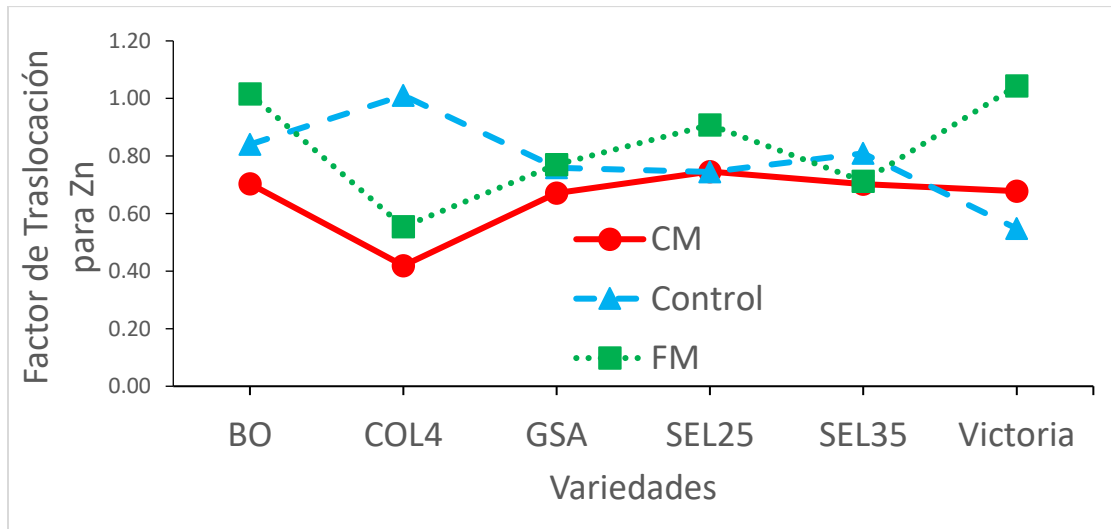


Figura 33. Interacción entre el factor variedad de girasol ornamental y el factor cepa de HMA con respecto a la traslocación (concentración de metal de órganos aéreos/ concentración de metal de raíces) de zinc 40 días después de iniciado el experimento.

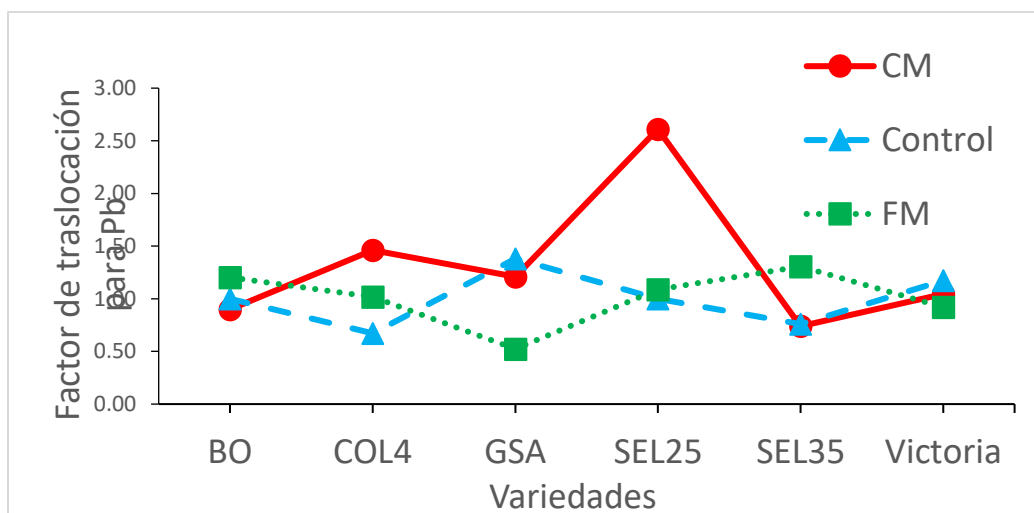


Figura 34. Interacción entre el factor variedad de girasol ornamental y el factor cepa de HMA con respecto a la traslocación (concentración de metal de órganos aéreos/ concentración de metal de raíces) de plomo 40 días después de iniciado el experimento.

Cuadro 24. Absorción de Zn (mg/kg) en distintas variedades de girasol inoculados con HMA y sin inocular en un experimento de fitorremediación Pachuca, Hidalgo.

Tratamiento	Zn(mg/kg)	Tratamiento	Zn (mg/kg)	Tratamiento	Zn (mg/kg)
CON	1.13 a	CON	2.23 b	CON	1.05 a
BO CM	1.51 (33) a	Victoria CM	1.24 (-44) a	GSA CM	1.28 (22) ab
FM	1.53 (35) a	FM	1.30 (-41) a	FM	1.47 (40) b
CON	1.33 a	CON	1.49 a	CON	0.88 a
col4 CM	1.56 (17) a	sel35 CM	1.52 (2) a	sel25 FM	1.04(19) ab
FM	1.54 (16) a	FM	1.52 (2) a	CM	1.36 (55) b

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Entre paréntesis se muestran los decrementos (-) y los aumentos (+) de la absorción de Zn (mg/kg) de los tratamientos con HMA con respecto al control sin inóculo.

Cuadro 25. Absorción de Pb (mg/kg) en distintas variedades de girasol inoculados con HMA y sin inocular en un experimento de fitorremediación Pachuca, Hidalgo.

Tratamiento	Pb(mg/kg)	Tratamiento	Pb (mg/kg)	Tratamiento	Pb (mg/kg)
CON	1.96 a	CON	2.45 a	CON	2.32 a
BO CM	2.32(18) a	Victoria CM	2.38(-2.7) a	GSA CM	2.70(16) a
FM	3.61 (84) b	FM	1.96 (-20) a	FM	(-0.25) a
CON	2.26 a	CON	1.11 a	CON	1.25 a
col4 CM	2.42 (-7) a	sel35 CM	1.47 (32) a	sel25 FM	1.1(-12) a
FM	2.19 (-3.1) a	FM	1.24 (12) a	CM	1.25 (0) a

Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Entre paréntesis se muestran los decrementos (-) y los aumentos (+) de la absorción de Zn (mg/kg) de los tratamientos con HMA con respecto al control sin inóculo.

Hay diferencias significativas entre la concentración de zinc en la raíz y la concentración de zinc en el follaje, siendo la concentración en la raíz mayor. La concentración de plomo tanto en raíz como en follaje es la misma en términos generales. (Cuadro 26).

Cuadro 26. T de student para Zn y Pb entre raíz y tallo de toda la población.

t de student		
Zn	T	-5.34685
	P-value	3.4915*10⁻⁷
Pb	T	0.5329
	P-value	0.5948

Cuadro 27. Absorción de metal total por planta (AMT) (mg de metal por planta). En un experimento de fitorremediación en el jal histórico CEUNI en Pachuca, Hidalgo

Tratamiento		Pb				
		(mg/kg)	Zn(mg/kg)	peso seco(g)	AMT- Pb	AMT-Zn
Belleza Otoño	CM	2.33	1.51	10.85	0.025	0.016
	FM	3.21	1.53	8.19	0.026	0.013
	Control	1.96	1.13	6.00	0.012	0.007
colecta4	CM	2.43	1.61	8.58	0.021	0.014
	FM	2.19	1.54	7.44	0.016	0.011
	Control	2.18	1.29	9.76	0.021	0.013
GSA	CM	2.71	1.29	14.75	0.040	0.019
	FM	1.73	1.48	9.99	0.017	0.015
	Control	2.32	1.05	15.15	0.035	0.016
sel25	CM	1.25	1.37	9.11	0.011	0.012
	FM	1.10	1.05	7.57	0.008	0.008
	Control	1.25	0.88	7.25	0.009	0.006
sel35	CM	1.47	1.53	8.09	0.012	0.012
	FM	1.25	1.52	6.57	0.008	0.010
	Control	0.94	1.49	12.49	0.012	0.019
Victoria	CM	2.38	1.24	7.56	0.018	0.009
	FM	2.38	1.31	7.06	0.017	0.009
	Control	2.46	2.23	5.65	0.014	0.013

Condiciones físicoquímicas del suelo del jal minero al final del experimento de fitorremediación.

Según la NOM-021-SEMARNAT el jal no se encuentra contaminado de plomo ya que el valor del control se encuentra por debajo de 35mg/kg (0.1 mg/kg) mientras que los niveles de Zn se encuentran en un nivel considerado como normal (6.83 mg/kg). El pH del jale en todos los casos se considera como medianamente alcalino. La conductividad en el control es ligeramente salina mientras que la conductividad de los tratamientos tiene niveles despreciables de salinidad en todos los casos. La cantidad de fósforo es alta en todos los casos, así como el porcentaje de materia orgánica. Según la densidad aparente, el suelo se clasifica como arcilloso (**Cuadro 28**).

Cuadro 28. Condiciones físicoquímicas del suelo al final del experimento (40 días después de establecido el experimento de fitorremediación). Para cada tratamiento se midió PH, conductividad (C), cantidad de fósforo inorgánico (P) en mg/g, el porcentaje de materia orgánica, densidad aparente (g/ml), densidad real (g/ml), concentración de plomo (mg/kg) y concentración de zinc (mg/kg).

Tratamiento	PH	CE(dS/m)	P (mg/g)	% M.O.	D.A.(g/ml)	D.R.(g/ml)	Pb(mg/kg)	Zn(mg/kg)	
BO	CM	7.49	0.97	0.009	2.69	1.10	2.17	1.74	6.90
	FM	7.32	0.64	0.013	3.14	1.05	2.54	2.76	6.79
	Control	7.26	0.78	0.011	8.52	0.93	4.60	1.01	5.86
colecta4	CM	7.40	0.57	0.009	5.38	1.04	3.83	1.72	5.51
	FM	7.47	0.86	0.009	6.95	0.96	3.83	2.9	5.59
	Control	7.32	0.71	0.008	4.03	1.10	2.28	0.16	5.72
GSA	CM	7.23	1.01	0.006	2.02	1.09	2.63	1.61	6.78
	FM	7.32	0.82	0.008	0.00	1.17	1.78	2.69	6.67
	Control	7.38	0.93	0.015	5.15	1.09	3.25	1.90	7.04
sel25	CM	7.69	0.65	0.017	8.29	1.11	3.26	1.55	6.43
	FM	7.40	0.63	0.008	7.17	0.99	1.75	1.37	5.05
	Control	7.56	0.91	0.008	8.74	1.06	1.72	2.47	5.38
sel35	CM	7.57	0.89	0.010	3.14	1.11	1.68	1.03	6.03
	FM	7.54	0.66	0.011	9.19	1.02	2.28	1.9	4.95
	Control	7.62	0.69	0.007	7.62	1.08	1.82	1.13	5.31
Victoria	CM	7.48	0.68	0.009	3.59	0.94	1.70	1.40	5.99
	FM	7.35	0.80	0.007	6.50	0.80	1.75	3.02	5.33
	Control	7.39	0.62	0.009	3.59	1.01	3.27	0.65	5.42
Control		7.68	1.37	0.011	5.36	1.08	1.90	1.63	6.83

DISCUSIÓN

Los tratamientos control presentaron colonización, lo cual se debe a la presencia de las esporas de HMA nativas del sitio que fueron encontradas. Juárez-Vázquez *et al.* (2015) y (García-Roa *et al.*, 2018) también encontraron esporas nativas en este mismo jal.

La alta presencia de fósforo y materia orgánica en el presente experimento se puede explicar debido al humus de lombriz y peat moss presente en el cepellón a la hora del trasplante, Sin embargo, los estudios de Juárez-Vázquez *et al.* (2015) arrojaron que el jal es pobre en materia orgánica y en fósforo. El pH ligeramente alcalino encontrado se reporta como algo común en estos sitios (Medel-Reyes *et al.*, 2008).

En el jal de mina Dos Carlos en Pachuca Hidalgo la mayor concentración que se encontró de Zn y Pb en biomasa fue de 45 mg/kg y 14 mg/kg respectivamente (Hernández-Acosta *et al.*, 2009). Se necesitan más experimentos para explicar la baja concentración de dichos elementos en el presente experimento tanto en el suelo como en biomasa. De acuerdo con la norma NOM-021-SEMARNAT un suelo normal contiene 35 mg/kg de Pb mientras que uno peligroso contiene entre 100 y 300 mg/kg. En tanto que para zinc se considera un suelo adecuado valores mayores a 1mg/kg. Por lo tanto, no se considera que exista contaminación de Zn o de Pb en el suelo analizado.

El tratamiento de Gigante Simple Amarillo con *Funneliformis mosseae* absorbió 40% más Zn que su control y el 25 inoculado con Cerro del Metate absorbió 55% más que su respectivo control. Lo cual es consistente con estudios que afirman que la micorrización puede optimizar la absorción de Zn y de otros micronutrientes como Ni (Jamal *et al.*, 2006). BO-FM absorbió 84% más de Pb que el control. Barcos Arias *et al.*, (2016) afirma que la absorción de plomo es optimizada por la micorrización en diversas plantas, incluyendo el girasol. A pesar de lo anterior, las plantas no traslocaron la mayor cantidad de metal a sus órganos aéreos, en comparación con el estudio de Hernández-Acosta *et al.* (2016) donde la mayor cantidad de zinc y plomo se presentó en el tallo de girasol no micorrizado.

Finalmente, el tratamiento que mejor funcionó para fitorremediación fue GSA-

CM principalmente por su tamaño.

CONCLUSIONES

La floración depende de la variedad y no de los HMA. De la misma manera, el crecimiento depende solamente de la variedad y la variedad más grande es Gigante Simple Amarillo.

Cerro del Metate, en promedio, esporula más que *F. mosseae* pero es dependiente de la interacción inóculo-variedad. Ambos inóculos tuvieron la misma capacidad de colonizar las distintas variedades de girasol (cerca del 30%). La presencia de colonización en los tratamientos se puede explicar a la presencia de HMA nativos en el jal.

Estadísticamente GSA-FM absorbió 40% más zinc que su control y sel25-CM absorbió 55% más zinc que su control. Belleza de Otoño absorbió 84% más plomo que el control. ($P \leq 0.05$). Sin embargo, GSA-CM absorbió mayor volumen de ambos metales pesados debido a su tamaño.

El lugar del jal analizado posee propiedades fisicoquímicas de fertilidad aceptable y cantidad de Pb y de Zn aceptables.

El uso de hongos micorrízicos arbusculares puede ser beneficioso para absorber Zn y Pb dependiendo de la variedad. Estudios posteriores deberán enfocarse en evaluar las variedades Victoria, GSA y sel25 colonizados por HMA en suelos con alto grado de contaminación para evaluar sus propiedades de fitorremediación.

REFERENCIAS

- Adesodun, J. K., M. O. Atayese, T. A. Agbaje, B. A. Osadiaye, O. F. Mafe y A. A. Soretire (2010)** Phytoremediation potentials of sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for metals in soils contaminated with zinc and lead nitrate. *Water Air Soil Pollution* 207: 195-201, doi:10.1007/s11270-009-0128-3
- Alvarado, C., N. Dasgupta-Schubert, E. Ambriz, J. Sánchez-Yañez y J. Villegas (2011)** Hongos micorrízicos arbusculares y la fitorremediación de plomo. *Revista*

Internacional de Contaminación Ambiental 27:357-364.

Barcos Arias, M. S., J. J., Peña-Cabirales, A. Alarcón y M. Maldonado Vega (2015).

Enhanced Pb Absorption by *Hordeum vulgare* L. and *Helianthus annuus* L. Plants inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungi consortium. *International Journal of Phytoremediation* 17: 405-413.

Camarillo-Ravelo, D., M. Barajas-Aceves y R. Rodríguez-Vázquez (2015) Evaluación de la

fitotoxicidad de jales mineros en cuatro especies empleadas como bioindicadoras de metales pesados. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 31: 133-143.

García-Roa, N., Y. Vázquez-García, G. Rincón-Enríquez, E. Hernández-Acosta, E. E.

Quiñones-Aguilar (2018) Presencia de hongos micorrízicos arbusculares en rizosferas de plantas de un jal de mina en Pachuca Hidalgo. *Biotecnología y Sustentabilidad* 3(1): 56.

Gutiérrez-Ruiz, M., F. Romero y G. González-Hernández (2007) Suelos y sedimentos

afectados por la dispersión de jales inactivos de sulfuros metálicos en la zona minera de Santa Bárbara, Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 24(2): 170-184.

Hernández-Acosta, E. Mondragón-Romero, D. Cristobal-Acevedo, J. E. Rubiños-Panta y E.

Robledo-Santoyo (2009) Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 15(2): 109-114.

Hernández-Cuevas L. V., P. Guadarrama-Chávez, I. Sánchez-Gallen y J. Ramos-Zapata

(2012) Micorriza arbuscular, colonización intrarradical y extracción de esporas de suelo. *In. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración.* Álvarez S. J. y Monroy A. A. (Comps.). Fac. de Ciencias UNAM. DF, México. 1-16 pp.

INEGI (2015) Estadística de la industria minerometalúrgica. Fecha de consulta: 25 de julio 2018. Recuperado de:

http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/notasinformativas/ind_miner/NI-IM.pdf

Jamal, A., N. Ayub, M. Usman y A. G. Khan (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance

zinc and nickel uptake from contaminated soil by soybean and lentil. *International Journal of Phytoremediation* 4(3): 205-221.

January, M. C., T. Cutright, H. Van Keulen y R. Wei (2008) Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals? *Chemosphere* 70: 531-537, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.066>

Juárez Vázquez, L.V., G. Vela Correa, E. Cruz Chávez, A. Chimal Hernández, O.A. Acevedo Sandoval y F. Rivera Becerril (2011) Características de sustratos e identificación de plantas micorrizadas establecidas en presas de jales del distrito minero de Pachuca. *Sociedades rurales, producción y medio ambiente* 11: 98-112.

Juárez-Vázquez, L., E. Cruz-Chávez, T. Mier, A. Chimal-Hernández, G. Vela-Correa, F. Rivera-Becerril (2015). La micorriza arbuscular en tres jales (suelos antropogénicos) de Pachuca, Hidalgo. Research Gate.

Kayode Adesodun J., M. O. Atayese, T. A. Agbaje, B. A. Osadiaye. O. F. Mafe y A. A. Soretire (2010). Phytoremediation of potentials of sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*). *Water air soil pollution* 207:195-201. Doi: 10.1007/s11270-009-0128-3

Khalid, S., M. Shahid, N. K. Niazi, B. Murtaza, I. Bibi y C. Dumat (2016) A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*. doi: 10.1016/j.gexplo.2016.11.021

Khan, A. G., C. Kuek, T. M. Chaudhry, C. S. Khoo y W. J. Hayes (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41:197-207.

Lin, J., W. Jiang y D. Liu (2003) Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Bioresource Technology* 86: 151-155. doi:10.1016/S0960-8524(02)00152-9

Madera-Parra, C. A., E. J. Peña-Salamanca, y J. A. Solarte-Soto (2014) Efecto de la concentración de metales pesados en la respuesta fisiológica y capacidad de acumulación de metales de tres especies vegetales tropicales empleadas en la

fitorremediación de lixiviados provenientes de rellenos sanitarios. *Ingeniería y Competitividad* 16(2): 179-188.

Martín-Romero, F. y M. Gutiérrez-Ruíz (2010) Estudio comparativo de la peligrosidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 62: 43-53.

Medel-Reyes A., S. Ramos-Gomez, F. J. Avelar-González, L. A Godinez-Mora-Tovar y F. Rodríguez Valadez (2008) Caracterización de Jales Mineros y evaluación de su peligrosidad con base en su potencial de lixiviación. *Conciencia Tecnológica* 35: 32-35.

Mendoza-Amézquita, E., M. A. Armienta-Hernández, C. Ayora, A. Solera y E. Ramos-Ramírez (2006) Potencial lixiviación de elementos traza en jales de las minas La Asunción y Las Torres, en el Distrito Minero de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 23: 75-83.

Moreno M. E. (1996) Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 3^{ra} ed., UNAM, México DF. 393 p.

Nava-Ruíz, C., y M. Méndez-Armenta, M (2011) Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias* 16: 140-147.

Phillips J. M. y D. S. Hayman (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* 55:158-161, doi:10.1016/S0007-1536(70)80110-3

Prasad, M. N. V. y H. M. Freitas (2003) Metal hyperaccumulation in plants-Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 285-321, doi:10.2225/vol6-issue3-fulltext-6

Rashed, M. N. (2010) Monitoring of contaminated toxic and heavy metals, from mine tailing through age accumulation, in soil and some wild plants at Southeast Egypt. *Journal of Hazardous materials* 178: 739-746, doi:10.1016/j.jhazmat.2010.01.147

Romero, F. M., M. A. Armienta, M. E. Gutiérrez y G. Villaseñor (2008) Factores geológicos

y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Revista Internacional de Contaminación* 24: 43-54.

Ruiz Huerta, E. A. y M. A. Armienta Hernández (2012) Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 28: 103-117.

Sánchez, L.E. (1995) Manejo de residuos sólidos en minería. *Aspectos Geológicos de Protección Ambiental UNESCO* 1: 239-250.

Secretaría de Economía (Acciones de consulta) Fecha de consulta: 25 de julio 2018. Recuperado de: <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria>

SEMARNAT (2004) PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-138-SEMARNAT-2003, Que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y restauración. Fecha de consulta: 26 de julio 2018. Recuperado de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=708408&fecha=19/03/2004

Senen Barcos Arias, M.S., J. J. Peña-Cabriales, A. Alarcón y M. Maldonado Vega (2016) Enhanced Pb Absorption by *Hordeum vulgare* L. and *Helianthus annuus* L. Plants Inoculated with an Arbuscular Mycorrhizal Fungi Consortium. *International Journal of Phytoremediation* 17:405-413, doi: 10.1080/15226514.2014.898023.

Servicio Geológico Mexicano (SGM) (2016) Panorama Minero del Estado de Hidalgo. Fecha de consulta: 25 de julio 2018. Recuperado de <http://www.sgm.gob.mx/pdfs/HIDALGO.pdf>

Shahandeh, H., and L. R. Hossner (2002) Role of soil properties in phytoaccumulation of uranium. *Water Air Soil Pollution* 141:165-180, doi:10.1023/A:1021346828490

Shaw, J. (1990) *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects* (C. Press Ed.). New York, <https://www.crcpress.com/Heavy-Metal-Tolerance-in-Plants-Evolutionary-Aspects/Shaw/p/book/9780849368523>

Sommer, I.,P. Fernández, H. Rivas y M. E. Gutiérrez (2000) La geostatística como herramienta en estudios de contaminación de suelos. Análisis de caso:afectación

por arsénico, plomo y cadmio contenidos en jales mineros. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 16:205-214.

StatPoint Inc. (2005) StatGraphics Centurion XV version 15.02.06. Warrenton, Virginia, USA. www.statgraphics.com

Trinidad-Cruz J. R., E. E. Quiñones-Aguilar, L. V. Hernández-Cuevas, L. López-Pérez y G. Rincón-Enríquez (2017) Hongos micorrícicos arbusculares asociados a la rizósfera de *Agave cupreata* Trel. & Berger en regiones mezcaleras del estado de Michoacán, México. *Scientia Fungorum* 45:13-25.

Volke-Sepúlveda T., J. A. Velasco-Trejo y D. A. De la Rosa-Pérez (2005) Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. *Instituto Nacional de Ecología (INE-Semarnat)*.

ANEXOS

NOM-021-SEMARNAT

Interpretación de resultados

- Método- AS-02 para pH

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1-6.5
Neutro	6.6-7.3
Medianamente alcalino	7.4-8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

- Método AS-03 para densidad aparente y densidad real

Tipos de suelos	g/cm ³
Orgánicos y volcánicos	Menor de 1.00
Minerales	
Arcillosos	1.0 1.19
Francosos	1.20 1.32
Arenosos	Mayor a 1.32

- Método AS-07 para materia orgánica

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 - 6.0	0.6 - 1.5
Medio	6.1 - 10.9	1.6 - 3.5
Alto	11.0 - 16.0	3.6 - 6.0
Muy Alto	> 16.1	> 6.0

- Método AS-10 para contenido de fósforo en suelos alcalinos

Clase	mg Kg ⁻¹ de P
Bajo	< 5.5
Medio	5.5 - 11
Alto	> 11

- Método AS-14 para extracción de micronutrientes y de metales pesados

Clase	Fe	Cu mg kg ⁻¹	Zn	Mn
Deficiente	< 2.5	< 0.2	< 0.5	< 1.0
Marginal	2.5-4.5		0.5-1.0	
Adecuado	> 4.5	> 0.2	> 1.0	> 1.0

Clase	Cd mg kg ⁻¹	Pb	Ni
Normal	0.35	35	50
Peligroso	3-5	100-300	100

- Método AS-18 para conductividad eléctrica

CE dS m⁻¹ a 25°C	Efectos
< 1.0	Efectos despreciables de la salinidad
1.1 - 2.0	Muy ligeramente salino
2.1 - 4.0	Moderadamente salino
4.1 - 8.0	Suelo salino
8.1 - 16.0	Fuertemente salino
> 16.0	Muy fuertemente salino