

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Influencia de dos aislados de hongos micorrízico arbusculares
en la tolerancia a arsénico en helecho crespo (*Nephrolepis sp.*) y
avena (*avena sativa*).**

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

Ana María Villarroel Dávila

SANGOLQUÍ, JULIO DE 2007

HOJA DE LEGILIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Ana María Villarroel Dávila

CORDINADORA DE LA CARRERA

M.Sc. Mónica Jadán

SECRETARIO ACADEMICO

Abg. Vinicio Zabala

Sangolquí, 23 de julio de 2007

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. ANA MARÍA VILLARROEL DÁVILA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

23 de julio de 2007

M.Sc. Alma Koch
DIRECTORA

Dra. Karina Proaño
CODIRECTORA

REVISADO POR

Abg. Vinicio Zabala

DEDICATORIA

A mi familia por haber creído siempre en mí y haberme apoyado en todo momento.

Y creo que es justo dedicármelo a mi misma, por la tenacidad, la entrega, la convicción, la pasión y todo el esfuerzo entregado en este trabajo.

Ana María Villarroel Dávila

AGRADECIMIENTO

A mis padres por haberme apoyado en todo momento de mi vida, por creer en mí y permitirme ser lo que soy. A mi padre por su apoyo y ejemplo, a mi Madre querida que son su amor infinito, su fuerza y su positivismo ha llenado mi vida y me ha permitido tener esa entrega y ganas para alcanzar todas las metas que me he propuesto.

A mis hermanas, cuñados y sobrinos que me han ayudado tanto, gracias por su cariño y alegría, gracias por aguantar mi carácter y hacerme entender lo valioso de la vida.

A mi familia en general por estar siempre junto a mí llenándome de cariño y apoyo incondicional, gracias por darme la fuerza para seguir adelante.

A Pablo y su familia por ser clave en la culminación de mi carrera, gracias por haber estado a mi lado y brindarme apoyo muchas gracias.

A Jessy por iniciarme en el camino de la investigación, por su amistad y por su ejemplo, muchas gracias por todas las oportunidades que me ha brindado, por creer en mi, por su ayuda y apoyo tanto a nivel profesional como personal, mil gracias por todo. A su esposo Roberto y su pequeño por la amistad y el cariño que me brindaron.

A Almita Koch por su apoyo en la realización de mi tesis, por haberme acogido y guiado en la culminación de este paso tan importante y permitir alcanzar mi título.

A Kary Proaño muchas gracias por confiar tanto en mi, por su amistad y apoyo en todo lo que yo necesité, por su forma de ser, por sus consejos y por ayudarme en esta etapa de mi vida.

A la Master Mónica Jadán por su ayuda en trámites y documentos; más que todo por darme siempre ánimo, le agradezco mucho.

Al Doctor Luis Cumbal muchas gracias por todo lo que ha hecho por mi, ha sido una persona muy importante para la realización de mi tesis, no tengo palabras para expresarle toda mi gratitud y cariño, gracias por haberme guiado y estado siempre dispuesto a ayudarme, gracias por su amistad y por su apoyo moral y mas que nada por el ejemplo que ha dejado en mi para seguir preparándome en mi carrera.

A la Doctora María del Carmen González por su ayuda sincera y abierta, por haberme recibido en su laboratorio y capacitarme para culminar este trabajo, gracias por sus acertados consejos y por compartir sus elevados conocimientos. Gracias también a su esposo el Doctor Rogelio Carrillo por su ayuda en mi preparación.

A la Comisión de Energía Atómica por permitirme culminar mis análisis. Al Ing. Enrique Arévalo, Dr. Suarez, Ing. Paulina Guevara, Ing. Claudia Sangurima y en general a todas las personas que me colaboraron.

Al CEINCI por permitirme realizar mi proyecto de tesis en sus instalaciones, al Dr Aguirre, a la Ing. Erika Murgueitio a Miguel, muchas gracias por todo.

A Santiago por apoyarme y estar junto a mí dándome la fuerza para seguir, muchas gracias por ayudarme tanto y tener esa conexión conmigo.

A Sandra por ser una persona tan especial y haberme ayudado tanto, muchas gracias por tus conocimientos y por tu amistad, por haber compartido conmigo tantas cosas.

A Alma por brindarme su amistad y ayuda para mi preparación, por sus consejos, su apoyo y sus buenas intenciones para seguir adelante en nuestras carreras.

A mis compañeros del CEINCI que hemos compartido la lucha para alcanzar nuestro título, gracias por su alegría, optimismo y ayuda incondicional. Gaby muchas gracias por haberme ayudado en mi experimento. Un abrazo sincero con toda la gratitud a Dany, Dolores, Charles, Ricky, Marlene, Dianita y Romel, fueron un apoyo muy importante para mí.

A mis amigos y compañeros de curso por haber compartido las mismas inquietudes, frustraciones y ahora éxitos en nuestra carrera, mil gracias Gabys, Ivonne, Vinicio, Gaby, Vero, Kuki, Nubia, Karlita, Albert, Geovani, Juan Pablo y a todos muchas gracias.

A mis amigos en general por ser parte del apoyo que me ayudó para culminar mi tesis a Mona, Paty, Diana, Rober, Edwin, Luis, Pauli, Estefanía, Isabel y todos quienes de algún modo contribuyeron a mi realización, un gigantesco gracias.

Ana María Villarroel Dávila

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
LISTADO DE TABLAS	ix
LISTADO DE CUADROS	xi
LISTADO DE FIGURAS	xiii
LISTADO DE ANEXOS	xv
NOMENCLATURA UTILIZADA	xviii
RESUMEN	xx
ABSTRACT	xxi
CAPÍTULOS	
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	3
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.3.1 Objetivo General	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 MARCO TEÓRICO	6
1.4.1 Arsénico en el ambiente	6
1.4.2 Arsénico en plantas	7
1.4.3 Mecanismos de tolerancia en vegetales	9
1.4.4 Transformación de arsénico mediada por microorganismos	10
1.4.5 Micorriza	12

1.4.5.1	Morfología de Micorriza Arbuscular	13
1.4.5.2	Taxonomía	14
1.4.5.3	Descripción de especies de hongos micorrízicos arbusculares en estudio.....	15
1.4.5.4	Tolerancia a compuestos tóxicos en hongos micorrízicos arbusculares.....	17
1.4.5.5	Glomalina	18
1.4.5.6	Función de la glomalina en el suelo	20
1.4.6	Especies vegetales en estudio	21
1.4.6.1	Helecho (<i>Nephrolepis sp.</i>)	21
1.4.6.2	Avena (<i>Avena sativa</i>)	22
1.5	HIPÓTESIS.....	24
1.5.1	Hipótesis general.....	24
1.5.2	Hipótesis específicas	24
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS		25
2.1	PARTICIPANTES.....	25
2.2	ZONA DE ESTUDIO	25
2.3	PERÍODO DE INVESTIGACIÓN.....	26
2.4	DISEÑO.....	26
2.5	PROCEDIMIENTO.....	26
2.5.1	Material biológico.....	26
2.5.2	Montaje del ensayo 1: Siembra e inoculación en macetas con Helecho	26
2.5.2.1	Extracción de esporas.....	26
2.5.2.2	Esterilización del sustrato	27
2.5.2.3	Preparación de soluciones y estabilización de macetas.....	27
2.5.2.4	Siembra e inoculación	28
2.5.2.5	Labores de mantenimiento.....	28

2.5.3	Montaje del ensayo 2: Siembra e inoculación en macetas con Helecho y Avena.....	28
2.5.3.1	Extracción de esporas.....	28
2.5.3.2	Esterilización del sustrato.....	28
2.5.3.3	Preparación de soluciones.....	29
2.5.3.4	Siembra e inoculación.....	29
2.5.3.5	Labores de mantenimiento.....	29
2.5.4	Factores estudiados.....	30
2.5.4.1	Colonización micorrízica.....	30
2.5.4.2	Biomasa de las especies utilizadas.....	30
2.5.4.3	Cuantificación de glomalina.....	31
2.5.4.4	Contenido de arsénico en plantas.....	31
2.5.4.5	Contenido de fósforo en plantas.....	33
2.6	ANÁLISIS DE DATOS.....	34
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....		35
3.1	COLONIZACIÓN MICORRÍZICA.....	35
3.1.1	Avena.....	35
3.1.2	Helecho.....	40
3.2	BIOMASA AÉREA.....	44
3.2.1	Avena.....	44
3.2.2	Helecho.....	49
3.3	CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO.....	52
3.3.1	Avena.....	52
3.3.2	Helecho.....	57
3.4	CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO.....	60
3.4.1	Avena.....	60
3.4.2	Helecho.....	64

3.5 GLOMALINA.....	69
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	71
4.1 COLONIZACIÓN MICORRÍZICA.....	71
4.2 BIOMASA	73
4.3 CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO	74
4.4 CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO	76
4.5 GLOMALINA.....	76
CAPITULO V: CONCLUSIONES	78
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES	80
CAPITULO VII: BIBLIOGRAFIA.....	81

LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 1.4.1 Tabla de diferencias entre los tipos de hongos micorrízicos arbusculares.....	13
Tabla 1.4.2 Clasificación actual de los hongos micorrízicos arbusculares.....	15
Tabla 3.1 Tabla de Tratamientos establecidos para el factorial de tres niveles de micorriza por dos niveles de arsénico y por tres niveles de fósforo.....	35
Tabla 3.2 ADEVA del porcentaje de colonización micorrízica en Avena.....	36
Tabla 3.3 ADEVA del porcentaje de colonización micorrízica en Helecho.....	40
Tabla 3.4 Tabla de Tratamientos establecidos para el factorial de tres niveles de micorriza por dos niveles de arsénico y por tres niveles de fósforo.....	44
Tabla 3.5 ADEVA de la biomasa aérea en Avena.....	45
Tabla 3.6 ADEVA de la biomasa aérea en Helecho.....	49
Tabla 3.7 Tabla de Tratamientos establecidos para el factorial de tres niveles de micorriza por dos niveles de arsénico y por tres niveles de fósforo.....	53
Tabla 3.8 ADEVA concentración de Arsénico en Avena.....	53
Tabla 3.9 ADEVA concentración de Arsénico en Helecho.....	57
Tabla 3.10 Tabla de Tratamientos establecidos para el factorial de tres niveles de micorriza por dos niveles de arsénico y por tres niveles de fósforo.....	60
Tabla 3.11 ADEVA concentración de fósforo en Avena.....	61

Tabla 3.12 ADEVA concentración de fósforo en Helecho.....64

LISTADO DE CUADROS

	Página
Cuadro 3.1 Promedio de la colonización micorrízica al utilizar tres niveles de fósforo en ensayo de Avena	36
Cuadro 3.2 Promedio de la colonización micorrízica en macetas a utilizar la combinación de tres tipos de micorriza y tres niveles de fósforo.....	36
Cuadro 3.3 Cuadro de promedios de las interacciones entre los tres factores micorriza, arsénico y fósforo en ensayo de Avena.....	37
Cuadro 3.4 Promedio de la colonización micorrízica en la interacción de fósforo y micorriza en ensayo de Avena.....	40
Cuadro 3.5 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.....	41
Cuadro 3.6 Promedio de biomasa aérea al utilizar tres niveles de fósforo en ensayo de Avena.....	45
Cuadro 3.7 Promedio de biomasa aérea en las interacciones entre arsénico y fósforo en ensayo de Avena.....	46
Cuadro 3.8 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.....	46
Cuadro 3.9 Promedio de biomasa aérea al utilizar dos niveles de arsénico en ensayo de Helecho.....	49
Cuadro 3.10 Promedio de biomasa aérea en las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza en Helecho.....	50

Cuadro 3.11 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.....	54
Cuadro 3.12 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.....	58
Cuadro 3.13 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.....	62
Cuadro 3.14 Promedio de concentración de fósforo de la interacción entre arsénico y fósforo en Helecho.....	65
Cuadro 3.15 Promedio de concentración de fósforo al utilizar tres niveles de micorriza en Helecho.....	65
Cuadro 3.16 Promedio de concentración de fósforo de la interacción entre arsénico y micorriza en Helecho.....	66
Cuadro 3.17 Promedio de concentración de fósforo de la interacción entre fósforo y micorriza en Helecho.....	66
Cuadro 3.18 Promedio de concentración de fósforo de las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza en Helecho.....	67

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1.4.1: Vía principal de reducción y metilación de arsénico mediada por hongos.....	12
Figura 1.4.2: Espora de <i>Glomus mosseae</i> BEG 132, 40x.....	16
Figura 1.4.3: Espora de <i>Pacispora</i> sp. 40x.....	16
Figura 3.1 Colonización Micorrízica de <i>Pacispora</i> sp. y <i>Glomus mosseae</i> en Avena....	37
Figura 3.2 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en el porcentaje de colonización micorrízica en Avena	38
Figura 3.3 Foto de estructuras intraradicales de micorriza arbuscular presente en el interior de una raíz de Avena 40x.....	39
Figura 3.4 Porcentaje de Colonización Micorrízica de <i>Pacispora</i> sp. y <i>Glomus mosseae</i> en Helecho.....	42
Figura 3.5 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en el porcentaje de colonización micorrízica en Helecho.....	43
Figura 3.6 Estructuras intraradicales de micorriza en Helecho correspondientes a vesículas. 40x.....	44
Figura 3.7 Efecto de tratamientos sobre la biomasa aérea en Avena.....	47
Figura 3.8 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la biomasa aérea en Avena.....	48
Figura 3.9 Efecto de tratamientos sobre la biomasa aérea de Helecho.....	51

Figura 3.10 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en el porcentaje de colonización micorrízica en ensayo de Helecho.....	52
Figura 3.11 Concentración de arsénico en hojas de Avena medida por espectrofotometría de absorción atómica.....	55
Figura 3.12 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la concentración de arsénico en Avena.....	56
Figura 3.13 Concentración de arsénico en frondas de Helecho medida por espectrofotometría de absorción atómica.....	58
Figura 3.14 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la concentración de arsénico en Helecho.....	59
Figura 3.15 Concentración de fósforo en Avena medida por espectrofotometría UV....	62
Figura 3.16 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la concentración de fósforo en Avena.....	63
Figura 3.17 Concentración de fósforo en frondas de Helecho medida por espectrofotometría UV.....	68
Figura 3.18 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la concentración de fósforo en Helecho.....	69
Figura 3.19 Cantidad de Glomalina en tratamientos inoculados con <i>Pacispora sp.</i> y <i>Glomus mosseae</i>	70
Figura 3.20 Concentración de arsénico presente en glomalina extraída.....	70

LISTADO DE ANEXOS

	Página
Anexo 1: Colonización micorrízica en Avena	
Raíz de Avena micorrizada 10X.....	88
Raíz de Avena micorrizada Micelio 10X.....	88
Raíz de Avena micorrizada 10X.....	88
Anexo 2: Colonización micorrízica en Helecho	
Raíz de Helecho micorrizada Vesículas 10X.....	89
Raíz de Helecho micorrizada 10X.....	89
Raíz de Helecho micorrizada 10X.....	89
Anexo 3: Biomasa aérea.....	90
Anexo 4: Extracción de Glomalina.....	91

NOMENCLATURA UTILIZADA

ABSORCIÓN: Introducción o disminución de una especie dentro o a través de otra. Mecanismo de transporte de una sustancia dentro de un cuerpo.

ADSORCIÓN: Término empleado para definir la concentración de moléculas seleccionadas en la superficie de un cuerpo sólido, como cuando las materias colorantes se adhiere a una fibra.

BIOMERREMDIACION: Es el proceso en el que se emplean organismos biológicos para resolver problemas específicos medioambientales, como la contaminación.

BIOACUMULACIÓN: Proceso por el cual organismos que viven en un medio que contiene una concentración relativamente baja de una sustancia química pueden llegar a acumular en sus tejidos dicha sustancia, alcanzando concentraciones considerablemente más altas que las existentes en el medio, con el consiguiente perjuicio para la salud del organismo.

ESPORAS: Término que define un cuerpo orgánico minúsculo que consiste de una célula o de un grupo de varias células y que se desarrolla en forma de un nuevo individuo.

FITORREMDIACION: Es una técnica de remediación ambiental que hace referencia a varios usos de las plantas y árboles para descontaminar suelos contaminados mediante la extracción de los contaminantes del suelo y del agua.

GLOMALINA: Molécula proteica originada de exudados que producen la mayoría de los hongos micorrízicos arbusculares.

HIFA: Elemento filamentosos. Uno de los filamentos en forma tubular del micelio de un hongo.

HONGOS: Organismo del reino de los hongos. No contienen clorofila ni almidón y viven de materias orgánicas.

MICORRIZA: Asociación simbiótica entre las hifas de algunos hongos y las raíces de plantas superiores. Facilitan la absorción de nutrientes del suelo tanto al hongo como a la planta.

QUELATO: Estructura molecular en la que los iones metálicos se hallan unidos a un compuesto orgánico bidentado por valencias residuales.

TOLERANTES: Especies que pueden crecer o soportar determinadas condiciones ambientales, generalmente adversas como sequías, contaminantes.

TÓXICO: Agente o sustancia que actúa como veneno. Sustancias o desechos que pueden causar la muerte o lesiones graves o daños a la salud humana, si se ingieren o inhalan o entran en contacto con la piel. Sustancia perjudicial para los organismos vivos.

RESUMEN

En el presente estudio se efectuó un experimento con plantas de helecho crespo (*Nephrolepis sp.*) y avena (*Avena sativa*) inoculadas y no inoculadas con dos aislados de hongos micorrízicos arbusculares (*Pacispora sp.* y *Glomus mosseae*), para determinar la influencia y contribución de especies de micorriza en la tolerancia a contaminación por arsénico, adicionalmente se incluyó el fósforo como elemento competidor en la toma de arsénico por parte de la planta. En el ensayo se establecieron tratamientos con la combinación de dos concentraciones de arsénico 100 y 50 mg/Kg, tres de fósforo 0, 25 y 50 mg/Kg y las especies de micorrizas mencionadas. Las macetas fueron mantenidas durante ocho semanas y al finalizar el experimento se cuantificó el porcentaje de colonización micorrízica, la biomasa aérea de las plantas, la concentración de fósforo y la concentración de arsénico en las hojas de helecho y avena. De acuerdo con los resultados, se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos y se determinó que las especies de micorrizas estudiadas contribuye de manera positiva en la absorción de arsénico y su traslocación hasta las hojas, así como también aumentó la biomasa aérea en macetas inoculadas de las plantas hospederas mostrando el aporte al desarrollo de las plantas en sustratos con altas concentraciones de arsénico. Adicionalmente se determinó que al existir mayor concentración de fósforo en suelo, la concentración de arsénico en las plantas es menor y viceversa por lo que este elemento es un limitante en la dinámica del arsénico. Referente al hospedero se estableció que la avena muestra mejor respuesta en el ensayo junto con la especie de micorriza *Pacispora sp.* Se efectuó también la extracción de glomalina de las macetas con inoculación demostrando la producción de esta proteína por parte de las micorrizas estudiadas y se identificó la presencia de arsénico en su estructura determinándose que contribuye a la captura del contaminante. Finalmente se establece que los resultados del estudio demuestran que la inoculación de las dos especies de hongos micorrízicos arbusculares contribuye a la absorción y tolerancia de arsénico en las plantas de avena y helecho.

Palabras clave: Hongos micorrízicos arbusculares, inoculación, *Pacispora sp.*, *Glomus mosseae*, arsénico, fósforo, hospedero.

ABSTRACT

In the present study an experiment was realized with plants of fern (*Nephrolepis sp.*) and oat (*Avena sativa*) inoculated and not inoculated with two isolated arbuscular mycorrhizal fungi (*Pacispora sp.* and *Glomus mosseae*) to determine the influence and contribution of mycorrhizal species in the tolerance to contamination by arsenic. Additionally, phosphorus was included as a competitor element in the uptake of arsenic by the plant. In practice, the treatments were established with the combination of two arsenic concentrations (100 and 50 mg/Kg), three of phosphorus (0, 25 and 50 mg/Kg) and mycorrhizal species. The plants were maintained during eight weeks and when concluding the experiment, the percentage of mycorrhizal colonization, air biomass of the plants, concentration of phosphorus and concentration of arsenic in the fern and oat leaves were evaluated. In accordance with the results, a significant difference among the treatments was found and it was determined that the mycorrhizal species contribute in a positive way to arsenic absorption. Also, the air biomass increased in inoculated plants, showing the contribution to the development of the plants in an environment with high arsenic concentrations. Additionally, it was determined that when a higher phosphorus concentration exists, the arsenic concentration in the plants is smaller. For this performance, phosphorus is a limiting factor in the dynamics of arsenic. Regarding the host, it was established that the oat shows a better response in the experiment together with *Pacispora sp.* Also, the extraction of glomalin from the plants with inoculation demonstrated the production of this protein for a studied species of mycorrhizal fungus and the arsenic presence was identified in its structure. This component determined the contribution of glomalin in the capture of the pollutant. Finally, in this study it was demonstrated that the inoculation of the two species of arbuscular mycorrhizal fungus contributes to the absorption and arsenic tolerance in the plants of oat and fern.

Palabras clave: Arbuscular mycorrhizal fungi, inoculation, *Pacispora sp.*, *Glomus mosseae*, arsenic, phosphorus, host.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La contaminación ambiental ocasionada por compuestos tóxicos ha sido una problemática importante a nivel mundial y también constituye un factor significativo a estudiarse en nuestro país.

Actualmente la contaminación por arsénico ha sido uno de los problemas más peligrosos de tratar, ya que la alta concentración de este elemento puede causar varios problemas ambientales y de salud a organismos expuestos. En lugares con alto contenido de arsénico, tanto en agua como en suelo, se han llevado a cabo programas de remediación, siendo así el caso de accidentes de Bhopal o Chernobyl (OMS, 2006). También es conocido el caso de Bangladesh, que actualmente enfrenta el envenenamiento accidental de al menos 85 millones de sus 125 millones de habitantes debido a la contaminación del agua de consumo con arsénico.

En nuestro país, uno de los problemas más serios de contaminación por arsénico se encuentra en el área de Papallacta, en donde la alta concentración de este elemento se ha vuelto un factor determinante para la posible afectación de flora, fauna y población humana del lugar.

Se han efectuado estudios por De la Torre et al. (2004), para analizar la situación ambiental de las zonas afectadas por el derrame de petróleo ocurrido en el 2003 por rotura del SOTE en el sector Sucos - San Juan, ubicado en la Reserva Cayambe Coca. Estos estudios han sido únicos en su tipo, determinándose la presencia de arsénico en la zona.

Este grupo de investigación de la Escuela Politécnica Nacional, detectó concentraciones de arsénico muy altas comparadas tanto para el límite permitido por el TULAS (Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria) que es de 0.05 mg/L para agua; como para lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que es de 0.001mg/L. Se determinó que existen niveles de hasta 10.56 mg/L en

muestras de aguas termales de la cuenca del río Tambo, 3.94 mg/L en el reservorio de Aguas termales “Jamaco” y 0.67 mg/L en la Laguna al lado oeste.

En sitios próximos a la desembocadura del río Tambo en la Laguna de Papallacta, se determinó que en suelo removido existe una concentración de arsénico de 98.6 mg/Kg. En suelo bajo la remoción se encontró una concentración de 163.9 mg/Kg, en la entrada a la laguna 39.3 mg/Kg y en suelo alejado de la laguna 74.98 mg/Kg, siendo estos valores mayores a los permitidos para suelos de uso agrícola según lo establecido por TULAS que es de 5mg/Kg.

Según los análisis del grupo de investigación liderado por De la Torre, la concentración de arsénico en el área de Papallacta es alta y sugiere ser originada por la estructura geológica del suelo y sedimentos de la zona, los cuales corresponden a una formación volcánica.

Análisis mineralógicos confirman su origen volcánico, por presencia de silicatos de magnesio, andesita, sanidina, enstatita y el registro de la presencia de trazas de pirita, en proceso de oxidación y de óxidos de hierro, además también la estibnita y la arsenopirita compuestos comúnmente encontrados en yacimientos de origen hidrotermal en el Ecuador.

En base a la información que se presenta sobre el grado de contaminación de arsénico en Papallacta, es necesario y emergente plantear nuevos estudios que permitan tratar el suelo contaminado, buscando aplicar nuevas metodologías de biorremediación, dentro de las cuales la asociación de especies vegetales y microorganismos es una herramienta clave, en donde los hongos micorrízicos arbusculares han desempeñado un papel importante en la estabilización de plantas en ambientes contaminados contribuyendo a la detoxificación de suelos.

1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La problemática actual de contaminación por arsénico en nuestro país requiere del estudio de nuevas metodologías de biorrecuperación que provean una solución práctica a este inconveniente ambiental.

Las metodologías clásicas de recuperación de suelos contaminados incluyen tratamientos químicos y físicos que resultan muy costosos, de eficacia moderada y pueden llegar a destruir la estructura del suelo así como su fertilidad, o incluso esparcir la contaminación a sitios no contaminados (Alloway, 1993). Actualmente se ha aplicado técnicas de biorremediación que han ayudado mucho en el tratamiento de contaminantes como en el caso del arsénico, constituyéndose una técnica alternativa efectiva, amigable para el ambiente y de bajo costo recurriendo a sistemas biológicos (Chaney et al., 1997).

Dentro de estas técnicas, la fitorremediación es una herramienta muy usada que utiliza plantas en la recuperación de suelos contaminados. Se ha utilizado varias especies vegetales con características de resistencia, transformación e hiperacumulación de compuestos arsenicales; sin embargo existen ciertas limitaciones para el crecimiento y desarrollo de las plantas debido al efecto tóxico que puede presentar el arsénico, por lo que es necesario introducir sistemas biológicos como la simbiosis entre hongos micorrízicos y las plantas (Lovley y Coates, 1997).

En este contexto los hongos micorrízicos arbusculares juegan un papel muy importante en la dinámica del arsénico en el sistema suelo-planta. A través de varios trabajos de investigación se ha podido demostrar que este tipo de hongos simbioses puede proveer resistencia de las plantas hospederas a la toxicidad por arsénico e incluso a concentraciones altas de metales pesados (Sharples et al., 1999). Este proceso se da mediante complicados mecanismos selectivos de unión o de completa inmovilización de toxinas por parte de los hongos micorrízicos (Leyval et al., 1998).

Por lo nombrado anteriormente, se ha establecido que los hongos micorrízicos prestan varios beneficios, pudiendo ser usados para potencializar programas de fitorremediación. Entre las plantas hospederas más usadas están especies como *Trifolium repens*, *Nicotiana tabacum*, *Helianthus annuus*, *Lycopersicum*, *Holcus lanatus*

y *Pteris vittata* que es una especie de helecho que presenta mayor tolerancia a concentraciones elevadas de arsénico considerándolo uno de los mayores hiperacumuladores (Abid et al., 2005).

Con base en lo anterior, la investigación busca un mejor conocimiento de la dinámica de la simbiosis en condiciones de contaminación por arsénico para conseguir una nueva herramienta para la remediación ambiental. Conocer la influencia de la colonización del hongo en la planta, la interacción del arsénico con factores abióticos externos y la capacidad de absorción del elemento tóxico en las especies vegetales estudiadas.

Adicionalmente de los resultados que arroje el estudio se podrán plantear nuevas líneas de investigación que permitan establecer soluciones para problemas de contaminación con arsénico basados en el uso de plantas con asociación de hongos micorrízicos propios del suelo. La investigación constituiría también una base para otros estudios de problemas ambientales que se presentan en la actualidad en la industria petrolera por derrames de hidrocarburos así como compuestos aromáticos y de explotación minera en donde existe alto grado de contaminación por metales pesados en la zonas de extracción, todos estos con un impacto ambiental en el ecosistemas naturales y afectación directa a la población de nuestro país.

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo General

Estudiar la influencia de dos aislados de hongos micorrízico arbusculares en la tolerancia de helecho cesposo *Nephrolepis sp* y avena *Avena sativa* a suelos contaminados con arsénico.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la colonización radical de dos especies de hongos micorrízicos arbusculares en *Nephrolepis sp.* y *Avena sativa*.
- Determinar la influencia de arsénico vs. fósforo en el desarrollo de *Nephrolepis sp.* y *Avena sativa*.
- Demostrar la captura de arsénico por parte de la glomalina producida por las especies de hongos micorrízicos estudiadas.
- Medir la concentración de arsénico en hojas de *Nephrolepis sp.* y *Avena sativa*.

1.4 MARCO TEÓRICO

1.4.1 Arsénico en el ambiente.

El arsénico es un metaloide que se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre con una concentración media de 2 mg/Kg y está presente en cantidades ínfimas en todo tipo de rocas, suelos, agua y aire; este tipo de elemento puede existir en cuatro estados de valencia: -3, 0, +3 y +5, en condiciones de reducción; la forma predominante es el arsenito (As III); el arsenato (As V) suele ser la forma estable en condiciones oxidadas. El arsénico elemental no es soluble en agua, en cambio las sales de arsénico tienen una amplia gama de solubilidades en función del pH y de las condiciones iónicas (Gómez-Camirero et al., 2001).

En aguas superficiales y subterráneas el arsénico comúnmente se encuentra en estado de oxidación +5 (arseniato) y +3 (arsenito) y en suelos el arsénico puede añadirse en forma de diferentes compuestos, tanto de carácter inorgánico: arsenito y arsenato, como orgánico (Carbonell, 1995).

El Arsenato (As^{+5}) es la especie estable en condiciones habituales de aireación (Deuel y Swoboda, 1972). En condiciones naturales de pH, el As^{+5} existe en disolución como H_2AsO_4^- y HAsO_4^{2-} ($\text{pKa}_1=2.3$, y $\text{pKa}_2=6.8$ y $\text{pKa}_3=11.6$). En este estado de oxidación, el Arsénico es retenido por el suelo (Calvo et al., 2003).

Según la Organización Mundial de la Salud, el arsénico es un elemento que está ampliamente distribuido en gran número de minerales y las mayores concentraciones, en general, se dan en forma de arseniuros de cobre, plomo, plata y oro o como impurezas en sulfuros y los principales minerales que contienen arsénico son arsenopirita (FeAsS), rejalgar (As_4S_4) y oropimente (As_2S_3).

El contenido de arsénico de la corteza terrestre está entre 1.5 y 2 mg/Kg, siendo el elemento número veinte en la lista de los elementos más abundantes (N.A.S., 1977). Aunque el arsénico es estable en condiciones reductoras (forma trivalente), no es frecuente encontrarlo en su estado fundamental. La forma oxidada, arsenato, aunque es la más abundante en la naturaleza (se encuentra normalmente en depósitos

sedimentarios), está fuertemente enlazada a los minerales del suelo, particularmente a los óxidos e hidróxidos metálicos coloidales, mediante enlaces iónicos (Wauchope, 1983). La forma arsenato, está escasamente disponible para la planta, no alcanzando concentraciones superiores a 1 mg/Kg de arsénico. Los suelos sin contaminar contienen entre 0.2 y 40 mg/Kg de arsénico, mientras suelos que han sido tratados con este elemento pueden contener más de 550 mg/Kg (Walsh y Keeney, 1975).

Otras zonas donde se dan con frecuencia altas concentraciones de arsénico son las áreas de actividad geotérmica notable (Lancaster et al., 1971), así como los suelos procedentes de roca madre de origen volcánico (Ferguson y Gavis, 1972).

Según Carbonell (1995), las características físicas y químicas del suelo son importantes para el control de su capacidad adsorptiva y la disponibilidad de arsénico a las plantas. Una amplia variedad de compuestos de arsénico se pueden absorber por las plantas, pero tienen diferentes efectos tóxicos. Las transformaciones que se producen en el suelo y la disponibilidad de estos compuestos son dos factores importantes para la contaminación del sistema suelo-planta.

1.4.2 Arsénico en plantas.

La fitotoxicidad del arsénico viene determinada por la forma química presente en el suelo. El arsenito es más fitotóxico que el arsenato y ambos son mucho más fitotóxicos que el metanoarsoniato monosódico (MSMA) y el ácido cacodílico (CA) (Carbonell, 1995)

Woolson (1973), determinó que la textura del suelo es un factor importante en la fitotoxicidad del arsénico añadido al suelo. Altas proporciones de arsenato de calcio aplicadas desembocan en residuos de arsenato en suelos de textura gruesa. Estos residuos causan reducción en el crecimiento de varias plantas incluyendo algodón, soja y arroz. Se ha establecido que cuando los suelos presentan un pH cercano a 5, el arsénico en forma de arsenato representa una fuente tóxica, ya que se encuentra en forma absorbible por la planta. La absorción del arsenato varía entre especies vegetales, en general, la raíz presenta concentraciones más altas de arsénico en relación con hojas

(Olson et al., 1940).

Según Meharg y Macnair (1990), todos los aniones son fuertemente adsorbidos a la superficie de la membrana radical, posteriormente sigue una conducción metabólica, una transferencia selectiva al simplasto y, por último, son transportados a la parte superior de la planta.

En particular, la adsorción del arsenito y del arseniato en la superficie radicular externa es bastante rápida e intensa, obteniéndose de esta forma concentraciones muy altas de arsénico en las raíces de plantas que se desarrollan en cultivo hidropónico (Wauchope, 1983).

Se ha establecido que la toma de arsenato se relaciona directamente con la cantidad de fósforo presente en el suelo, ya que se asume que en la planta los dos elementos siguen la misma ruta de fitoabsorción, esto se debe a que el arsenato y el fosfato son químicamente similares, presentan características semejantes en el sistemas de transporte y compiten por los mismos sitios en los suelos (Clements y Munson, 1947).

Según Wauchope (1983), una vez que el arsénico ha sido absorbido por la planta, los compuestos de dicho elemento (particularmente como arsénico pentavalente), fluyen a través de la planta en pocas horas, moviéndose tanto simplástica (transporte activo de citoplasma a citoplasma) como apoplásticamente (transporte extracelular).

El mecanismo de transporte de los compuestos arsenicales por la raíz u hojas según Wauchope (1983), incluye las siguientes etapas:

Raíz → xilema → hojas → floema
Hojas → floema → raíces, parte aérea, xilema.

El transporte de arsenito desde las raíces está limitado por su alta toxicidad para las membranas radiculares. El arsenato es más rápidamente adsorbido y traslocado, debido a su menor toxicidad para las raíces; de tal forma, que si se trabaja con

cantidades no letales de este último compuesto, se pueden observar concentraciones similares tanto en hojas como en raíces.

Existe una gran controversia sobre el efecto que produce la adición de fósforo en la captura o absorción de arsénico. Según Carbonell (1995), a niveles de arsénico comparables a los del suelo, la adición de fósforo aumenta significativamente el contenido de arsénico en la planta; sin embargo, el efecto de arsénico sobre el fósforo no es consistente. La cantidad de fósforo en la disolución del suelo parece gobernar la toma de arsénico en la planta, porque cuando la concentración de fósforo en la solución del suelo es alta, la absorción de arsénico se reduce.

1.4.3 Mecanismos de tolerancia en vegetales.

El mecanismo de tolerancia en plantas hiperacumuladoras de arsénico involucra la disminución en absorción de arsenato relacionado a la supresión del sistema de absorción de alta afinidad de fosfato, el secuestro en la pared celular y la compartimentalización en la vacuola. Estos factores son los responsables de la detoxificación en plantas (Meharg y Macnair, 1992).

Los efectos que causa el arsénico en plantas tienen relación con el fósforo. La molécula de fosfato es análoga del arsenato y presentan un mecanismo parecido de transporte hacia la planta, por lo que el arsénico inhibe la ruta de formación del ATP, al reemplazar al fósforo. Además, se ha establecido que se detiene el desarrollo radical en la planta disminuyendo el transporte de nutrientes del suelo. Adicionalmente se determinan efectos en frondas con amarillamiento incluso necrosidad de las mismas y cuando los niveles de este elemento son muy altos en la planta se evidencian daños genotóxicos en las células (Wauchope, 1983).

Los mecanismos de tolerancia al arsénico que se han desarrollado en algunas especies vegetales, no han sido esclarecidos totalmente; sin embargo, lo que se conoce es que la tolerancia a arsénico está dada por la relación fosfato-arsenato en la planta y con los diversos mecanismos de transportes de estos hacia la misma. Adicionalmente, se han propuesto algunas teorías que indican que se activa el sistema fenólico de defensa

de las plantas produciéndose fitoquelatinas que forman una molécula denominada glutatión, tales fitoquelatinas pueden detoxificar el arsénico en suelos contaminados en ambientes ácidos (Schutzendubel, 2002). Meharg y Hartley-Whitaker (2002), sostienen que es posible que los complejos formados de fitoquelatinas y arsénico sean secuestrados en vacuolas de las células vegetales y almacenados para disminuir la toxicidad de este compuesto.

En contribución con estas ideas, Prasad (1999) presenta un esquema del posible mecanismo de detoxificación de metales en plantas, en donde se nombra algunas biomoléculas que intervienen. Ha establecido que se dan varios mecanismos iniciándose con la inducción de proteínas mediante biomoléculas como metaloteonina, fitoquelatinas, ferritina y proteínas termoresistentes; un siguiente mecanismo de inducción y activación de enzimas antioxidantes donde intervienen catalasas, dismutasa superoxidasa y glutatión peroxidasa y finalmente se produce un alto nivel de ácidos orgánicos mediado por moléculas como fitato, malato, citrato, oxalato, succinato entre los principales.

Es necesario también, tomar en cuenta que evolutivamente se han establecido genotipos de plantas que presentan en su contenido genético información que les permite desencadenar todo un mecanismo complejo de tolerancia a compuestos tóxicos (Meharg et al., 1990), lo cual les proporciona una ventaja para desarrollarse en suelos con contaminantes a diferencia de las especies no resistentes.

Algunas especies de plantas no tolerantes al arsénico presentan como síntomas visibles: disminución en crecimiento, clorosis, necrosis en hojas, senescencia y muerte. La toxicidad por arsénico, induce disminución en la integridad de membranas de mitocondrias, aparato de Golgi, inhibición de enzimas de actividad desconocida y enzimas de la biosíntesis de clorofila de la cadena de transporte fotosintético de electrones y de fosforilación (O'Neill, 1991).

1.4.4 Transformación de arsénico mediada por microorganismos.

El uso de microorganismos y las asociaciones que estos presentan con algunas

especies vegetales constituyen una herramienta biotecnológica con amplias aplicaciones a nivel de programas de remediación.

Se han registrado muchos trabajos en donde se comprueba la contribución de dichas asociaciones en suelos contaminados, interviniendo también en el ecosistema del suelo cerca de las raíces de las plantas mostrando interacciones con demas organismos.

Se pueden encontrar especies de la rizósfera como *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Frankia*; sin embargo, la que más sobresale es la simbiosis entre hongos micorrízicos arbusculares con plantas superiores, la cual se proyecta como una estrategia novedosa y eficaz de remoción de compuestos tóxicos peligrosos como el arsénico (González-Chávez et al., 2004).

Las transformaciones de arsénico realizadas por microorganismos están dadas mediante reacciones de oxidación y metilación, este mecanismo está involucrado en la redistribución de este elemento en la tierra y su ciclo global.

La oxidación como tal involucra la conversión de la molécula tóxica AsO_2^- a la menos tóxica AsO_4^{3-} . En bacterias se da la metilación de arsénico inorgánico la cual es mediada por la formación de metano en bacterias metanogénicas, estableciéndose que este podría ser su mecanismo de detoxificación.

Dicho mecanismo involucra la reducción de AsO_4^{3-} a AsO_2^- , seguida por una metilación hasta dar la dimetilarsina. Los hongos también son capaces de transformar compuestos de arsénico en forma inorgánica u orgánica en metilarsinas volátiles como se muestra en la figura 1.4.1. Esta vía se da aeróbicamente por la reducción de AsO_4^{3-} a AsO_2^- , seguido de varios pasos de metilación produciendo trimetilarsina, consiguiendo finalmente moléculas de arsenobetaína que es una de las especie arsénical menos tóxicas (Phillips, 1990).

mientras que el hongo obtiene fotosintéticamente derivados de componentes de carbono, todo mediante una interacción raíz-hongo-suelo, denominada asociación micorrízica.

Existen siete diferentes tipos de asociaciones micorrízicas reconocidas que abarcan diferentes grupos de hongos y plantas hospederas según como se muestra en la tabla 1.4.1 (Harley y Smith, 1983):

Tabla 1.4.1: Tabla de diferencias entre los tipos de hongos micorrízicos arbusculares (Harley y Smith, 1983).

Tipo	Micorriza arbuscular	Ecto micorrizas	Ectoendo Micorrizas	Micorrizas arbutoides	Micorrizas monotropoides	Micorrizas ericoides	Micorrizas Orquidioides
Hifas Septadas	- (+)	+ -	+ -	+	+	+	+
Hifas en Células	+	-	+	+	+	+	+
Hifas Enrolladas	+ -	-	-	-	-	+	+
Arbúsculo	+	-	-	-	-	-	-
Manto	-	+ (-)	+ (-)	+	+	-	-
Red Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Vesículas	+ -	-	-	-	-	-	-
Plantas	Plantas Vasculares	Gimnospermas Angiospermas		Arbutus Pyrola	Monotropaceae	Ericales	Orchidaceae
Clorofila	+	+	+	+ -	-	+	+ -
Hongo	Glomero-	Mayoría Basidiomicetos, pero algunos Asco- y Zigo				Asco- (Ba	Basid-

Nota: - = ausencia, + = presencia, (+)= algunas veces presente, (-)= algunas veces ausente, +- = presente o ausente, Glomero- =Glomeromicetos, Basid- = Basidiomicetos, Asco- = Ascomicetos, Zigo = Zigomicetos.

1.4.5.1 Morfología de la Micorriza arbuscular

La micorriza arbuscular tradicionalmente fue denominada endomicorriza o micorriza endotrófica así como micorriza vesículo arbuscular y solía ser abreviada como MVA, sin embargo se tomó en cuenta que no todos los hongos son capaces de producir vesículas (Brundrett, 1999); por este motivo Klironomos 2000, sugirió que el

término se reemplace por el de micorriza arbuscular, ya que especies dentro de la familia Gigasporaceae (*Gigaspora* y *Scutelospora*), no forman estructuras vesiculares, sino solo arbusculares, por lo cual se tomará la denominación Micorriza Arbuscular (MA).

Según Bago et al. (1998), la asociación MA involucra a hongos Zigomicetos del orden de los Glomales y las raíces de gran diversidad de plantas, las estructuras presentes en la micorriza arbuscular se puede dividir en:

A. Estructuras en raíces

- Hifas: éstas son no septadas cuando son jóvenes y se ramifican dentro del córtex.
- Arbúsculos: intrincadamente ramificados en células del córtex.
- Vesículas: estructuras de almacenamiento que se forman en algunos géneros de estos hongos.

B. Estructuras en suelo

- Micelio: una red abundante de hifas en el suelo cuya función es auxiliar en la absorción y transferencia de nutrientes del suelo a la raíz.
- Esporas: estructuras asexuales esféricas (20-100 μm de diámetro), éstas se forman en puntas finales hifales en el suelo o mas raramente en raíces (algunas especies micorrízicas).

1.4.5.2 Taxonomía

La taxonomía de los HMA ha sido difícil de analizar claramente, debido a la incapacidad de propagar este tipo de hongos bajo condiciones *in Vitro*, como resultado no se conoce el ciclo completo de vida de estos hongos. Por esta razón, por mucho tiempo la taxonomía se basó en la morfología de sus esporas principalmente (Gerdermann y Nicholson, 1963).

En 1986, Walker considera la forma de germinación y las características de las paredes de las esporas para la clasificación de HMA, posteriormente en 1990, Morton y Benny crean el orden de los Glomales, donde se agruparon a todos los hongos formadores de micorriza arbuscular.

Estudios posteriores en el 2001 de Schubler et al. y en el 2004 por Oehl y Sieverding, consideraron características moleculares, morfológicas y ecológicas para ubicar a los hongos arbusculares en el Phylum Glomeromycota (Tabla 1.4.2).

Tabla 1.4.2: Clasificación actual de los hongos micorrízicos arbusculares (Schubler et al., 2001; Oehl y Sieverding, 2004).

SUBDIVISIÓN: <i>Glomeromycota</i>		
CLASE: <i>Glomeromycetes</i>		
ORDEN	FAMILIA	GÉNERO
<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i>
		<i>Pacispora</i>
<i>Diversisporales</i>	<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora</i> y <i>Scutellospora</i>
	<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i> y <i>Entrophospora</i>
	<i>Gerdemanniaceae</i>	<i>Pacispora</i> (= <i>Gerdemannia</i>)
	<i>Diversisporaceae</i>	<i>incertae sedis</i> (<i>Glomus</i> Grupo C) <i>ined.</i>
<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>
<i>Archaeosporales</i>	<i>Geosiphonaceae</i>	<i>Geosiphon</i> <i>peiforme</i>
	<i>Archaeosporaceae</i>	<i>Archaeospora</i>

1.4.5.3 Descripción de especies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en estudio.

Glomus mosseae



Figura 1.4.2: Espora de *Glomus mosseae* BEG 132, 40x. (Navas, 2006)

Es una especie de HMA perteneciente al orden de los Glomerales, familia Glomeraceae y género *Glomus*. Este tipo de hongos presenta esporas de color café anaranjado o café amarillento, de tamaño aproximado a 100-260 μm , cuya pared tienen varias láminas. Forma hifas intraradicales, arbuscúlos y vesículas, sus hifas son de 3 - 6 μm y crecen generalmente en forma paralela al eje de la raíz, las vesículas se producen esporádicamente, pero aumentan cuando la micorriza envejece (INVAM, 1999).

Esta especie de hongo puede presentar también esporas con *peridium* que es una estructura que las rodea es 10 - 38 μm de espesor, en hifas robustas (8 - 18 μm entre las paredes 1.6 - 3.5 μm de espesor) mezclados con muchas hifas de ramificación más finas (2 - 5 μm a < 1 μm de espesor). El *peridium* no altera la estructura de la pared de la espora parece ser lábil y generalmente puede perderse después de varios cultivos sucesivos (INVAM, 1999).

Pacispora sp.



Figura 1.4.3: Espora de *Pacispora* sp. 40x (Villaruel, 2007)

Es una especie de HMA perteneciente al orden de los Glomerales, *Pacispora* es un género recientemente descrito dentro de la familia Glomeraceae por Oehl y Sieverding (2004). Las esporas se forman terminalmente en la hifa. Ésta es una característica que solo comparten con *Glomus* y *Paraglomus*.

Se han descrito siete especies de *Pacispora*, que pueden ser morfológicamente diferenciadas por la estructura superficial de la espora, la presencia, posición y las características de la ornamentación de la pared, su color y tamaño. El tipo de ornamentación que se presentan en la pared externa de las esporas puede ser: hoyos,

proyecciones en forma de tubos, botones o verrugas en la pared externa dependiendo de la especie, sin embargo existen dos especies de *Pacispora* que se caracterizan porque la superficie de la espora es lisa. Las especies con proyecciones en la pared de la espora presentan un color hialino, crema o blanco opaco.

Tres de las especies de *Pacispora* fueron encontradas abundantemente a grandes alturas de los Alpes Suizos, sin embargo la ocurrencia de este género en regiones templadas, mediterráneas y tropicales sugiere que es un género ubicuo y adaptado a diferentes climas (Oehl y Sieverding, 2004).

La pared de la espora de este tipo de HMA se encuentra usualmente dividida en tres subcapas, desde la cual la espora germina directamente a través de la pared externa y la posición de la órbita de germinación en la pared interna es poco visible. Esta característica de germinación es compartida con *Scutellospora*, *Acaulospora* y *Entrophospora* pero no con *Glomus* y *Paraglomus*. En cuanto a las características de tinción de las estructuras del hongo dentro de la raíz y las características de la hifa sustentora de las esporas se asemejan más a las especies del género *Glomus* (Oehl y Sieverding, 2004).

1.4.5.4 Tolerancia a compuestos tóxicos en hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

Los HMA presentan un papel muy importante en la planta, así como también en el ecosistema, sin embargo no se ha documentado lo suficiente en cuanto a su función en suelos contaminados.

Los hongos micorrízicos son parte esencial en la absorción y transferencia de nutrimentos desde el suelo a la planta hospedadora, y cuando existe contaminación del suelo con elementos tóxicos se afecta la colonización por parte de la micorriza, se disminuye la diversidad de especies y plantas en estos ambientes (Shetty et al., 1995).

Weissenhorn y Leyval (1996) y Griffioen et al. (1994) mencionaron que las plantas que se desarrollan en un ambiente contaminado por compuestos tóxicos y que son colonizadas por HMAs, presentan una disminución en absorción de contaminantes y efectos tóxicos.

González-Chávez (2000), comprobó que la inoculación de HMA aislados de un área contaminada por arsénico, en plantas de *Holcus lanatus*, contribuyeron a disminuir la sensibilidad e incrementar su tolerancia a este contaminante.

Actualmente, se han propuesto hipótesis de los posibles mecanismos que los HMAs presentan para tolerar elementos tóxicos como:

- Acoplamiento a la pared celular. Esta propiedad depende de la capacidad de intercambio catiónico que los HMAs tienen y a sus propiedades intrínsecas. Las estructuras de HMAs presentes en las células intraradicales presentan condiciones químicas, que les permite la alta acumulación en el hongo (Weiersbye et al., 1999). Se ha propuesto que la concentración de fosfatos, ácidos débiles y pH neutro son factores que favorecen la formación de complejos y precipitados en estructuras intraradicales de HMAs que restringen la transferencia del elemento tóxico del hongo a la célula radical (Leyval et al., 2001).
- Otro posible mecanismo es el secuestro y acumulación de compuestos tóxicos, el cual es afectado por características del ión, su carga y la capacidad de formar complejos con ligandos orgánicos. González-Chávez (2000) sostiene que el micelio puede tener la capacidad de intracelularmente formar precipitados densos en forma de agregados cristalinos, estos se han encontrado abundantemente en las láminas más externas de la pared celular, evitando el ingreso de arsénico a sus estructuras.

Es claro que el mecanismo de tolerancia desarrollado por HMAs gira alrededor de las diferentes estructuras que estos presentan sobre todo por los procesos físicos que pueden tener con elementos como el arsénico.

1.4.5.5 Glomalina.

De acuerdo a la influencia que presentan los HMA en la estabilidad del suelo, se ha establecido que algunos hongos secretan exudados que intervienen en la agregación

de partículas actuando como gomas o pegantes, los cuales pueden ser polisacáridos que las hifas producen. En el caso de HMA se menciona que la glomalina, proteína que producen todas las hifas de estos hongos, parece involucrarse en este proceso. El nombre de la glomalina se derivó de la antigua ubicación de estos hongos dentro del orden de los Glomales (González-Chávez et al., 2004).

La glomalina es una glicoproteína producida abundantemente en hifas y esporas de MA en suelo y en raíces. Hasta su descubrimiento en 1996 por la científica de suelo Sara F. Wright, se confundía esta proteína como un componente no identificable del suelo que impregna la materia orgánica, atándolo al lúgamo, la arena, y partículas de arcilla. Actualmente se conoce que la glomalina captura el carbón de 30 a 40 %, formando los grupos de agregados del suelo. La proteína es insoluble en su estado natural y con posible carácter hidrófobo. Esta propiedad puede permitir la penetración de aire y un eficiente drenaje del agua, así como cubrir los agregados y proteger el material iniciando la agregación de partículas, minerales del suelo, otros microorganismos y materia orgánica (Wright y Upahyaya, 1998).

La glomalina puede estar presente en los agregados en cantidades de 3 a 10 veces mayores que los carbohidratos comunes extraídos con agua caliente, ya que la extracción de glomalina no es posible en esas condiciones. Lo anterior significa que es una molécula compleja que requiere para su extracción de un tratamiento drástico, esto sugiere también que es una molécula estable y resistente a la descomposición (González-Chávez et al., 2004).

Nichols (2003) reportó que la glomalina pesa 2 a 24 veces más que el ácido húmico. Hasta ahora se pensaba, que éste era el contribuyente principal al carbón de suelo; pero el ácido húmico contribuye sólo aproximadamente con 8 % del carbono, por lo cual la glomalina es un importante componente del suelo y contribuye con la fracción de carbón de los suelos.

Para la cuantificación de la glomalina, el análisis se basa en la determinación de proteínas totales, glomalina fácilmente extraíble (GFE) y glomalina total (GT). Los valores de proteínas totales se utilizan como un parámetro confiable, debido a que los extractos crudos representan en su mayoría el contenido de glomalina. Para la GFE, la

glomalina se libera fácilmente por extracción y calentamiento en autoclave; esta fracción considera proteína de recién producción. La GT involucra a la proteína que se produce, libera y acumula por un período mayor, por lo que se requiere de numerosas extracciones para obtener el mayor rendimiento de proteína (González-Chávez et al., 2004).

Nichols (2003), reporta que la vida media de la glomalina puede ser entre 7 y 42 años; siendo mayor a la vida media de diferentes productos del suelo de origen microbiano. De esta manera, esta molécula, al estar fuertemente atrapada dentro de micro y macroagregados, representa un importante reservorio de Carbono en el suelo.

1.4.5.6 Función de la glomalina en el suelo.

El proceso de agregación que ocurre en el suelo se ha identificado como un mecanismo para resistencia de fuerzas erosivas del aire y del agua, además de ser trascendental para acumular materia orgánica y carbono. La acumulación ocurre porque los residuos orgánicos se encapsulan por arcilla, limo y bioproductos protectores durante el proceso de la degradación. En éste proceso, la glomalina puede participar en el recubrimiento de los residuos orgánicos, lo que impide su rápida degradación. Debido al alto contenido de Carbono (30-50%), recalcitrancia, hidrofobicidad y fácil producción, la glomalina representa una fuente de secuestro de carbono en el suelo (González-Chávez et al., 2004).

Otra de las aparentes funciones que posee la glomalina según Rillig y Steinberg (2002), es que su producción puede ser una estrategia del hongo para mejorar su espacio físico, aunque su producción y secreción pueden constituir alto costo de Carbono y Nitrógeno para el hongo. Estos autores observaron que el uso de partículas pequeñas (>106 µm) para simular un suelo no agregado, disminuyó la longitud hifal en 80% en comparación con partículas de mayor tamaño (710-1180µm), las cuales simulaban un suelo agregado, pero el rendimiento de glomalina fue siete veces mayor cuando el hongo se desarrolló en partículas pequeñas.

Actualmente pocos estudios han identificado un posible papel de la glomalina en

la captura de elementos potencialmente tóxicos vertidos en los suelos. Se propone que al ser un exudado importante de los hongos MA, se relacionaría a contribuir en supervivencia y adaptación de plantas asentadas en lugares contaminados, sin embargo estos estudios no se han dilucidado aún con mayor detalle (González-Chávez, 2005).

1.4.6 Especies vegetales en estudio.

1.4.6.1 Helecho (*Nephrolepis* sp.)

Esta especie de helecho es una de las más comunes difundida en la naturaleza. Pertenece a la familia Polipodiáceas, su nombre científico deriva de las palabras *nephros* (riñón) y *lepis* (escama). La "escama reniforme" hace referencia a los indusios en forma de escama sobre las esporas y procede de las zonas tropicales de América, de África y Australia.

Según Navarrete et al. (2006), *Nephrolepis* sp presenta un rizoma bien desarrollado, escamoso, sin tubérculos. Frondes de 70 - 100 x 5 - 12 cm, con pecíolo moderadamente escamoso. Pinnas 2.5 - 6 x 0.6 - 1.4 cm, triangular-oblongas, en ocasiones algo falcadas, con la base truncado-auriculada o auriculada.

Entre las características que presenta este tipo de helecho es su crecimiento rápido, ya que por los estolones que presenta puede originarse fácilmente otra planta; se cultiva en invernaderos climatizados y muy luminosos, es el helecho en maceta más importante en cultivo. Presenta diversas interacciones con organismos de la rizósfera, siendo la más importante la simbiosis con los hongos micorrízicos arbusculares, lo que permite que el helecho adquiera varios beneficios al igual que las plantas superiores.

Se ha seleccionado para el estudio a *Nephrolepis* por pertenecer al grupo de helechos, que tienen registro de ser potenciales acumuladores de arsénico como estudios que han identificado el uso de helechos para recuperación de suelos contaminados al constituirse una de las especies que presenta adaptabilidad en varios ecosistemas. Los helechos constituyen una importante opción para implementar estrategias de fitorremediación de suelos mineros contaminados con metales pesados y metaloides entre estos el arsénico. Se ha establecido que una especie de helecho como *Pteris vittata*

actúa como hiperacumulador de arsénico según Chen et al. (2002), Abid et al. (2002): Bhaskar et al. (2004), entre otros donde se demuestra que se pueden alcanzar a acumular hasta 1000 mg/Kg.

1.4.6.2 Avena (*Avena sativa*).

La avena es una especie vegetal perteneciente a la familia de las Gramíneas (Gramineae), cuyo nombre científico es *Avena sativa*, se cultiva por el grano, que se usa como forraje para caballos y ganado vacuno, así como cereal para consumo humano. La planta verde sirve, a menudo, para elaborar henos, ensilados, como pasto, y la paja constituye una excelente cama para el ganado. La avena es también valiosa en las prácticas de rotación de cultivos en suelos agrícolas y ganaderos.

Según el estudio de Ávila et al. (2000), la avena es una planta anual con raíz fibrosa, en su crecimiento juvenil tiene colmos (tallos) erectos, de 0.50-1.80 m de altura, verde a gláucos. Presenta hojas alternas con las láminas foliares planas de aproximadamente 20 cm de largo por 2 cm de ancho; lígula membranácea casi truncada, de menos de 5 mm de largo, dentada. Tiene una panícula unilateral erecta o colgante, de aproximadamente 30 cm de largo; espiguillas generalmente biflosculadas de 1.7 - 2.5 cm de largo sin las aristas, sobre pedicelos engrosados bajo la espiguilla.

Florece de abril a noviembre, en su mayor parte de junio a septiembre en el hemisferio norte; y de octubre a diciembre en el hemisferio sur; muy raramente en marzo. En cuanto a su distribución, esta especie es cultivada en las regiones templadas en ambos hemisferios ya sea como forraje o grano.

Actualmente, el uso de gramíneas está ampliamente distribuido a nivel mundial por su importancia alimenticia, así como también en la aplicación dentro de las nuevas tecnologías de remediación ambiental. La avena constituye una alternativa importante para la absorción de arsénico, ya que se han realizados estudios en Bangladesh sobre remoción de contaminantes arsenicales en aguas con arroz y ciertos cultivos de avena (Nickson et al., 1998; Berg et al., 2001)

El arroz, hasta el momento, es la gramínea más estudiada donde se han hecho

algunos ensayos para probar la resistencia de esta especie a arsénico obteniéndose buenos resultados. Por esta razón la avena constituye una importante variante para remediar suelos contaminados con compuestos arsenicales.

1.5 HIPÓTESIS

1.5.1 Hipótesis general

Las especies de hongos micorrízicos arbusculares, *Pacispora sp.* y *Glomus mosseae*, contribuyen a la tolerancia de Helecho crespo y Avena a arsénico.

1.5.2 Hipótesis específicas

- El fósforo influencia la absorción de arsénico en las plantas y en su crecimiento.
- La glomalina tiene la capacidad de capturar arsénico.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 COLABORADORES

La investigación se realizó con la colaboración del personal de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Se contó con el apoyo de la Ing. Jessica Duchicela quien mediante el proyecto “Comportamiento funcional de la micorriza arbuscular en ambientes contaminados por metales pesados” con financiamiento interno de la ESPE hizo posible la realización del presente proyecto de investigación. Adicionalmente, se tuvo la colaboración técnica de la Directora y Codirectora asignadas para dirigir la tesis, la M.Sc. Alma Koch y la Dra. Karina Proaño respectivamente.

Se contó con el apoyo del Centro de Investigaciones Científicas de la ESPE, en donde se efectuó la parte experimental con colaboración del Dr. Luis Cumbal, PhD. Adicionalmente intervino la Dra. María del Carmen González-Chávez del Colegio de Postgraduados de México como colaboradora externa.

2.2 ZONA DE ESTUDIO

El experimento de laboratorio se estableció en el Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército y en la Comisión de Energía Atómica localizados en Sangolquí, que se encuentra ubicado a una latitud: S 0° 20' / S 0° 10' y Longitud: W 78° 30' / W 78° 15' a 2280 msnm.

El muestreo se realizó en el área de Papallacta, páramo que se extiende de los 3000 a 4000 msnm, presenta clima frío y húmedo con mas de 1500 mmm de lluvia al año, la temperatura media es de 6.6 °C, con una latitud: S 0° 30' / S 0° 20' y Longitud: W 78° 15' / W 78° 0', su hidrografía presenta los ríos Papallacta, Quijos, Tambo, Victoria, Antisana, Blanco, Tablón, Jatunhuaycu; y las Lagunas de Papallacta, Tumiguino, Sucus, y Santa Lucía (Instituto Geográfico Militar).

2.3 PERÍODO DE INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en un período de ocho meses, iniciándose el trabajo en el mes de septiembre del 2006 y finalizándose en el mes de abril del 2007.

2.4 DISEÑO

El diseño experimental establecido fue de bloques completamente al azar, con tres repeticiones en un arreglo factorial de 3 X 2 X 3 con un testigo absoluto. El primer factor contempla las especies de HMA: testigo, *Glomus mosseae* BEG 132 y *Pacispora sp.* el segundo factor representa las dos concentraciones de arsénico 100 mg/Kg y 50 mg/Kg y el tercer factor representa las concentraciones de fósforo 0, 50, 25 mg/Kg.

2.5 PROCEDIMIENTO

2.5.1 Material biológico.

En la presente investigación fueron utilizadas semillas de avena (*Avena sativa*) y explantes de helecho crespo (*Nephrolepis sp.*) para la implantación del ensayo. Adicionalmente, fueron estudiadas dos especies de HMA *Glomus mosseae* BEG 132 proveniente de suelos contaminados con arsénico y cobre de México proporcionados por el Departamento de Edafología en el área de microbiología ambiental del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México y *Pacispora sp.* extraída de suelos contaminados con arsénico de la zona de Papallacta de la provincia de Napo, Ecuador. Ambos inóculos fueron mantenidos en cultivos trampa monospóricos en el Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI), lo que garantizó trabajar con un grupo de esporas de la misma especie y tener el material suficiente para el montaje del ensayo, tanto para *G. mosseae* como para *Pacispora sp.*

2.5.2 Montaje del ensayo 1: Siembra e inoculación en macetas con Helecho.

2.5.2.1 Extracción de esporas.

Se siguió la técnica de tamizado húmedo y decantación propuesta por Gerdeman y Nicholson (1963); en donde fueron tomados 100 g del sustrato de los cultivos trampa para *Glomus mosseae* BEG 132 y para *Pacispora sp* separadamente. La muestra de sustrato fue colocada en suspensión en aproximadamente 2 L de agua, agitada mecánicamente durante cinco minutos y fue dejada en reposo tres minutos. La suspensión fue pasada a través de una serie de tamices de 140 μm y 40 μm , y lavada con abundante agua. La fracción obtenida en los tamices fue colocada en cajas petri que posteriormente se llevaron al estéreo microscopio y se extrajeron las esporas de las dos especies de hongos a utilizarse.

2.5.2.2 Esterilización del sustrato.

El sustrato utilizado fue arena de río, la cual fue lavada repetidamente con abundante agua potable hasta retirar las impurezas contenidas en esta, luego fue acidificada hasta alcanzar un pH de 5.8 con una solución de 0.25% de HCl y posterior a este tratamiento fue esterilizada por medio de vapor y presión en una autoclave durante 3 períodos de 1 hora cada uno. Finalmente, el sustrato fue secado y colocado en las macetas previamente esterilizadas con alcohol en un peso de 1.4 Kg de arena por cada maceta.

2.5.2.3 Preparación de soluciones y estabilización en macetas.

Las soluciones de arsénico y fósforo correspondientes fueron preparadas pesando 17.4 g y 5.4 g de arsenato dibásico de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) respectivamente para la solución 1 y la solución 2 y fueron disueltos en 1 L de agua destilada, estas soluciones fueron administradas en un volumen de 300 mL por cada maceta de los tratamientos establecidos. Para la solución 1 y 2 de fósforo, fueron pesados 0.08 g y 0.04 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) respectivamente y disueltos en 1 L de agua destilada, estas soluciones fueron finalmente colocadas en un volumen de 150 mL por cada maceta de los tratamientos específicos. Cada maceta fue sometida a estabilización colocándose una semana al ambiente.

2.5.2.4 Siembra e inoculación.

Para la implementación del ensayo, fueron extraídos explantes de *Nephrolepis sp.* que presentaban rizoma y frondas jóvenes. Estos fueron lavados abundantemente con agua para eliminar los restos de tierra y material vegetal presentes y se desinfectó el rizoma durante 4 minutos con hipoclorito de sodio al 5%, finalmente fue retirada la solución de cloro con lavados de agua destilada. En cada maceta fueron colocados tres explantes de helecho junto con el inóculo correspondiente.

2.5.2.5 Labores de mantenimiento.

La labor de mantenimiento fundamental fue el riego diario con agua destilada de forma manual en una dosis de 50 mL por maceta para evitar la saturación de líquido e impedir el lavado del contaminante.

2.5.3 Montaje del ensayo 2: Siembra e inoculación en macetas con Helecho y Avena.

2.5.3.1 Extracción de esporas.

Se siguió la técnica de tamizado húmedo y decantación propuesta por Gerdeman y Nicholson (1963). Fueron tomados 100 g del sustrato de los cultivos trampa para *Glomus mosseae* BEG 132 y para *Pacispora sp.* separadamente. La muestra de sustrato fue colocada en suspensión en aproximadamente 2 L de agua, agitada mecánicamente durante cinco minutos y fue dejada en reposo tres minutos. La suspensión fue pasada a través de una serie de tamices de 140 μm y 40 μm , y lavada con abundante agua. La fracción obtenida en los tamices fue colocada en cajas petri que posteriormente se llevaron al estéreo microscopio y se extrajeron las esporas de las dos especies de hongos a utilizarse.

2.5.3.2 Esterilización del sustrato.

El sustrato utilizado fue una mezcla de arena de río con humus. En el caso de la

arena fue procesada mediante el método ya nombrado en el ensayo 1 y el humus se esterilizó mediante autoclave durante 3 períodos de 1 hora cada uno. El sustrato fue secado y colocado en las macetas en proporciones determinadas para obtener la dilución de la concentración de arsénico presente en la arena utilizada en el ensayo 1. Finalmente fue colocado 1 Kg del sustrato total por cada maceta.

2.5.3.3 Preparación de soluciones.

La solución de fósforo fue preparada para ser colocada en las macetas correspondientes. Para la solución 1 y 2 de fósforo, fueron pesados 0,25 g y 0,15 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) respectivamente y fue disuelto en 1 L de agua destilada, estas soluciones fueron colocadas en un volumen de 150 mL por cada maceta.

2.5.3.4 Siembra e inoculación.

Para la implementación del ensayo fue efectuado un proceso de presimbiosis para garantizar el establecimiento de las plantas en la maceta con el contaminante, fueron colocados en vasos plásticos pequeños 150 g de arena con el inóculo tanto de *Glomus* BEG 132 y *Pacispora* con semillas de avena, trébol y arroz, estas macetas fueron mantenidas durante tres semanas antes de la implantación de todo el ensayo con riego diario con agua destilada. Transcurridas tres semanas fue realizado el transplante a las macetas que contenían arsénico y fósforo, adicionalmente fue colocado un explante de helecho, desinfectado con el procedimiento ya descrito y el inóculo correspondiente.

2.5.3.5 Labores de mantenimiento.

La labor de mantenimiento, al inicio de la siembra y transplante, fue el riego diario manual con agua destilada en una dosis de 50mL por maceta y, adicionalmente, fertilización dos veces por semana con una solución 1:1:1 de NH_4NO_3 , KNO_3 y MgSO_4 (Chun-Un et al., 2005). Al cumplir la cuarta semana fue establecido el riego de tres veces por semana con 1 solo día de fertilización. Las plantas fueron mantenidas en un período de ocho semanas en una cámara de crecimiento con similares condiciones todos los tratamientos.

2.5.4 Factores estudiados.

2.5.4.1 Colonización micorrízica.

Para evaluar la presencia del hongo micorrízico en las raíces fue determinada la colonización micorrízica mediante el método de clareo y tinción, propuesto por Phillips y Hayman (1970), el cual consistió en la separación de las raíces del suelo, lavadas con agua, cortadas en segmentos de aproximadamente 1 cm. Las raíces fueron colocadas en tubos de ensayo a los que se les añadió una solución de KOH al 10% hasta cubrir las por completo durante 1 hora. A continuación, fueron lavadas con agua corriente para eliminar el exceso de KOH. Fue adicionada una solución de HCl al 10% por 10 minutos hasta cubrir completamente las raíces para favorecer la acción del colorante. Transcurrido el tiempo de contacto con el ácido, fue eliminado el exceso de este y sin efectuar un lavado, fue aplicado el colorante azul de tripano al 0,05% en lactoglicerol y, posteriormente sometido a reposo 12 horas. Después de la tinción, fue colocado lactoglicerol durante 1 hora para retirar el exceso de colorante, luego las raíces teñidas fueron colocadas en un portaobjetos paralelamente y sobre ellas depositadas una o dos gotas de lactoglicerol. Enseguida fue cubierta la placa por un cubreobjetos, quedando de esta forma las laminillas listas para su observación al microscopio.

El porcentaje de infección fue determinado con base en los segmentos totales colonizados por el hongo y los segmentos que se montaron en el portaobjetos, haciendo también referencia de los segmentos con presencia de arbuscúlos y vesículas, según sea el caso (Giovannetti y Mosse, 1980). El porcentaje de colonización fue calculado con base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ colonización} = \frac{NSC}{NTSO} \times 100$$

Donde:

NSC = Número de segmentos colonizados;

NTSO = Número total de segmentos observados

2.5.4.2 Biomasa de las especies estudiadas.

Los componentes de cada planta (parte aérea) fueron cuidadosamente separados y colocados en sobres de papel previamente identificados, fueron secados en la estufa a una temperatura de 60 °C durante 72 horas. Posteriormente, fue determinado el peso seco con una balanza electrónica.

2.5.4.3 Cuantificación de glomalina.

El procedimiento de cuantificación de glomalina fue efectuado siguiendo la metodología propuesta por Wright y González-Chávez (1996). Las muestras fueron recolectadas tomando 1 g de sustrato y colocado en tubos de centrífuga con 8 mL de Citrato de Na 20mM cada muestra, los tubos fueron autoclavados por 60 min a 121° C y centrifugados a 10000 rpm por 10 min inmediatamente después de la extracción. A continuación fue removido el sobrenadante de cada tubo y almacenado a 4° C un volumen de 2 mL. El precipitado fue sometido al mismo proceso de extracción pero con una solución de Citrato de sodio 50mM, hasta que se obtuviera un sobrenadante de color amarilla claro. Finalmente fue medido el volumen total de la extracción con un cilindro graduado.

2.5.4.4 Contenido de arsénico en plantas.

El análisis del contenido de arsénico en las frondas de las especies estudiadas fue realizado por espectrofotometría de absorción atómica, siguiendo la metodología establecida por la Comisión de Energía Atómica. Inicialmente las muestras de las frondas de helecho y avena fueron sometidas a un proceso de digestión. Las muestras de las plantas analizadas fueron trituradas con nitrógeno líquido, secadas en estufa a menos de 40 °C y de estas fueron tomados 0.5 g El material fue colocado en diales que forman parte del equipo para digestión, en el caso del helecho al poseer menor material vegetal, fue adicionado 5 mL de ácido nítrico (HNO₃) al 67% y sometido a reposo 5 min. A continuación fue añadido 1 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y sometido a reposo durante 15 min aproximadamente agitando de vez en cuando para evitar la formación excesiva de espuma. En el caso de la avena, fueron adicionados 6 mL de ácido nítrico (HNO₃) y 1 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Transcurrido este tiempo los diales fueron tapados y colocados en sus chaquetas correspondientes ajustándolos al carrusel del equipo.

El equipo microonda fue programado y el carrusel con las muestras fue colocado en su interior. El programa utilizado presentaba potencia y tiempos establecidos, correspondientes a la siguiente información:

PASO	TIEMPO (min)	PODER	PRESION	TEMPERATURA
1	00:02:00	250	0	0
2	00:02:00	0	0	0
3	00:06:00	250	0	0
4	00:05:00	400	0	0
5	00:05:00	600	0	0

Transcurrido el tiempo, el carrusel del equipo fue retirado y colocado durante 15 min a enfriamiento, a continuación los diales fueron extraídos y destapados. Las muestras fueron sometidas a aireación durante 5 min, luego de esto los extractos fueron colocados en balones para aforo hasta 25 mL con agua destilada.

Una vez obtenidas las extracciones de cada muestra vegetal, fueron tomados 5 mL para medir el contenido de arsénico mediante espectrofotometría de absorción atómica por generación de hidruros en las instalaciones del Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la ESPE.

Los 5 mL de cada muestra fueron sometidos a una nueva digestión para transformar todo el arsénico contenido en el extracto a arsénico 3 para ser medido en su totalidad por el equipo. La muestra fue sometida con la solución reductora que contenía Ioduro de Potasio (KI) al 2.5% y Ácido Ascórbico al 2.5% en un volumen de 5 mL, adicionalmente fue agregado 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) 5M y fue sometida a reposo durante 45 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reducción, fue aforada a 25 mL con agua destilada y agitada para obtener una mezcla homogénea.

Al finalizar la digestión fue efectuada la lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica por generador de hidruros. La curva de calibración fue realizada en el equipo y a continuación fueron cuantificadas las muestras colocando un volumen de 250 µl de muestra con 10 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 1.5%. Las muestras que

presentaron una concentración mayor al establecido en la curva de calibración fueron diluidas.

2.5.4.5 Contenido de fósforo en plantas.

El contenido de fósforo fue determinado por colorimetría a partir de los extractos obtenidos mediante la técnica de microondas antes descrita. El fósforo total fue medido mediante el método del azul de molibdeno usando Acido Ascórbico como reductor, para identificarse por espectrofotometría UV, dicho análisis es conocido como el método de Olsen.

Previo a la lectura las muestras fueron sometidas a una dilución 1:50, tomándose 1 mL del extracto proveniente de las plantas estudiadas llevado a un volumen de 50 mL con agua destilada. A partir de la dilución fueron colocados 5 mL de la muestra en un tubo limpio adicionando 5 mL del Reactivo de color (Reactivo mezclado con Acido Ascórbico) y 15 mL de agua destilada, esta mezcla fue agitada suavemente para liberar CO₂. A continuación fue dejado en reposo por 60 minutos en un lugar oscuro. Cumplido este tiempo la absorbancia fue medida con espectrofotometría UV, contra agua a 880 nm usando celdas con una longitud de paso de luz de 10 mm.

Para la cuantificación total de la cantidad de fósforo presente en los extractos analizados fue realizada la curva de calibración para establecer la concentración de fósforo en las muestras. Según la absorbancia medida y finalmente aplicando la siguiente fórmula fue determinada la concentración de fósforo total presente en la planta en ppm:

$$P \text{ (mg/Kg)} = (a-b) \times d \times (vMs/pMs)$$

Donde: a = mg/L de P en el extracto de la muestra

b = mg/L de P en el blanco

d = factor de dilución

vMs = volumen al que se llevo el extracto de la muestra

pMs = peso de la muestra

2.6 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos se tabularon según los tratamientos y repeticiones propuestos efectuándose un análisis de varianza (ADEVA) para una distribución de los tratamientos completamente al azar, mediante el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) (SAS, 1990) y se utilizó la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad para la separación de los promedios y determinación de la diferencia estadística entre tratamientos.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 COLONIZACIÓN MICORRÍZICA

3.1.1 Avena

Los datos obtenidos del ensayo de avena fueron transformados para efectuarse el análisis de varianza, según los tratamientos establecidos. Estos corresponden al arreglo factorial de AxBxC equivalente a tres niveles de micorriza, dos de arsénico y tres de fósforo con un control como adicional como se muestra en la tabla 3.1:

Tabla 3.1 Tabla de Tratamientos establecidos para el factorial de tres niveles de micorriza por dos niveles de arsénico y por tres niveles de fósforo.

	Tratamientos	Micorriza x Concentración de Arsénico x Concentración de Fósforo
Control	M0*As0*P0	Sin Micorriza - 0 mg/Kg - 0 mg/Kg
1	M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg
2	M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 50 mg/Kg
3	M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg
4	M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg
5	M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 50 mg/Kg
6	M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg
7	M1*As1*P0	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg
8	M1*As1*P1	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg
9	M1*As1*P2	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg
10	M1*As2*P0	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg
11	M1*As2*P1	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg
12	M1*As2*P2	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg
13	M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg
14	M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg
15	M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg
16	M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg – 0 mg/Kg
17	M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg
18	M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg

La tabla 3.2 muestra el ADEVA de los datos obtenidos, donde se observa que existe diferencia estadística en los tratamientos establecidos a excepción de los niveles de fósforo y la combinación de arsénico con fósforo.

Los valores de esos tratamientos presentan valores menores que los de F tabular, presentando diferencia no significativa, es decir que los niveles de estos factores tienen un mismo comportamiento referente a la colonización micorrízica.

Tabla 3.2 ADEVA del porcentaje de colonización micorrízica en Avena.

F de V.	GL	SC	CM	F. Cal
TOTAL	56	21432.764	-----	-----
Tratamiento	18	7144.254	396.903	8.765**
As	1	510.680	510.680	11.278**
P	2	38.106	19.053	0.420 ^{NS}
AsxP	2	377.913	188.956	4.173**
M	2	16125.616	8062.808	178.065**
AsxM	2	255.341	127.670	2.819*
PxM	4	345.010	86.252	1.904 ^{NS}
AsxPxM	4	370.105	92.526	2.043 ^{NS}
Fact.vs adic	1	1689.351	1689.351	37.309**
Error Exper.	38	1720.638	45.279	-----

En los cuadros 3.1 y 3.2 se muestran los promedios de los tratamientos que no presentan diferencia significativa, estableciéndose que tiene igual comportamiento en cuanto a la colonización micorrízica, es decir no influyen en la variable analizada

Cuadro 3.1 Promedio de la colonización micorrízica al utilizar tres niveles de fósforo en ensayo de Avena.

NIVELES DE FÓSFORO	CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
P2	25 mg/Kg	25.499
P1	50 mg/Kg	24.165
P0	0 mg/Kg	23.475

Cuadro 3.2 Promedio de la colonización micorrízica en macetas a utilizar la combinación de tres tipos de micorriza y tres niveles de fósforo.

INTERACCIÓN DE FÓSFORO x MICORRIZA	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
M1*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg	41.242
M2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg	40.609
M1*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 25 mg/Kg	36.961
M1*P2	<i>Pacispora sp.</i> - 0 mg/Kg	35.889
M2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg	33.466
M2*P1	<i>G. mosseae</i> - 25 mg/Kg	31.254
M0*P0	Sin Micorriza - 0 mg/Kg	0
M0*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg	0
M0*P2	Sin Micorriza - 25 mg/Kg	0

En el caso de la interacción entre los tres factores: micorriza, arsénico y fósforo analizados tampoco existe diferencia estadística como se observa en el cuadro 3.3 únicamente se tiene el promedio de los tratamientos.

Cuadro 3.3 Cuadro de promedios de las interacciones entre los tres factores micorriza, arsénico y fósforo en ensayo de Avena.

TRATAMIENTOS	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN ARSÉNICO x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
M2*As1*P2	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	47.817
M1*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	45.583
M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	42.859
M1*As1*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	42.287
M1*As2*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	40.197
M1*As1*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	40.044
M2*As2*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	34.002
M1*As2*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	33.877
M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	33.400
M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	28.506
M1*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	26.194
M2*As2*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	24.072
M0*As0*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	0
M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	0
M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	0
M0*As1*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0
M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	0
M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	0
M0*As2*P2	Sin Micorriza - 0 mg/Kg - 0 mg/Kg	0

En los tratamientos estudiados se identifican que existen diferencias en cuanto a la colonización por parte de las especies de micorriza estudiadas, donde *Pacispora sp.* presenta mayor nivel de colonización con respecto a *G. mosseae*, como se observa en la Figura 3.1.

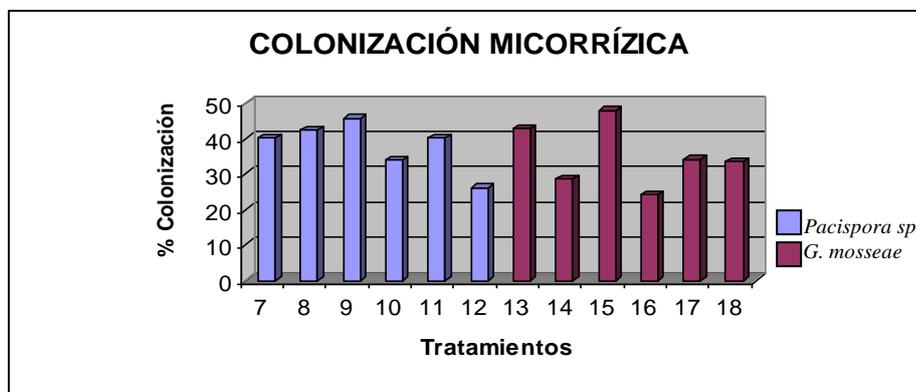


Figura 3.1 Colonización Micorrízica de *Pacispora sp.* y *Glomus mosseae* en Avena.

Las interacciones entre los niveles de los factores estudiados determinan la influencia de cada uno de estos en la colonización micorrízica, como se puede observar en la figura 3.2, se muestra el comportamiento del hongo en cada tratamiento con las posibles combinaciones establecidas.

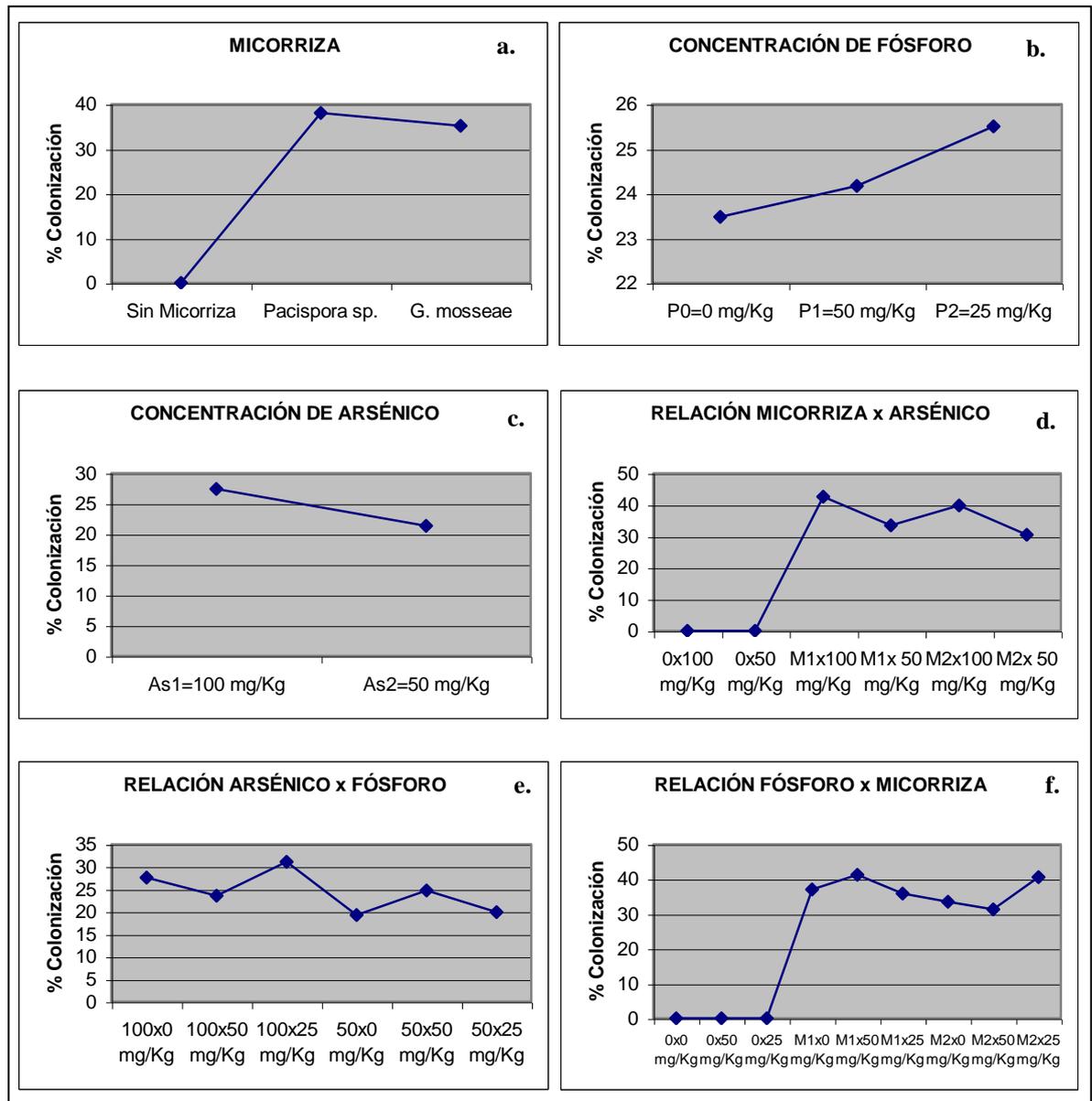


Figura 3.2 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en el porcentaje de colonización micorrízica en Avena

De acuerdo a la figura 3.2, en el gráfico **a.** se observa que la especie de micorriza 1 (*Pacispora sp.*) presenta mayor micorrización como se ha visto anteriormente con respecto a *G. mosseae*. El gráfico **b.** muestra que la colonización disminuye cuando existe la mayor concentración de fósforo, mientras que con la menor concentración y sin

adición de fósforo la micorrización aumenta. Con respecto a los niveles de arsénico se nota claramente que a mayor concentración de este elemento existe un mejor porcentaje de colonización, gráfico **c**.

Las interacciones entre factores presentan información sobre el comportamiento del hongo en cuanto a la simbiosis con la planta hospedera, como se ve en el gráfico **d**. la especie *Pacispora sp.* presenta mayor porcentaje de infección en la planta con la mayor concentración de arsénico, este comportamiento se repite con la especie *G. mosseae*. Con respecto a la interacción del fósforo con el arsénico en el gráfico **e**. se determina que el mejor tratamiento contiene las mayores concentraciones de arsénico y de fósforo, los dos siguientes mejores tratamientos presentan alta concentración de arsénico pero en estos casos existe una menor cantidad de fósforo y adicionalmente se observa que disminuye la micorrización con concentraciones. Finalmente la interacción entre fósforo y micorrizas inoculadas en el gráfico **f**. presenta que la colonización es mayor en el tratamiento que cuenta con alta concentración de fósforo y presenta la especie *Pacispora sp.*, sin embargo es importante indicar que existen gran número de tratamientos con alto grado de infección mientras exista menor concentración de fósforo.

En la figura 3.3 se muestra las estructuras encontradas en placas de tinciones radicales realizadas a partir de las plantas de avena. Se observa la presencia de estructuras del hongo como hifas formando micelio interno recorriendo la raíz.

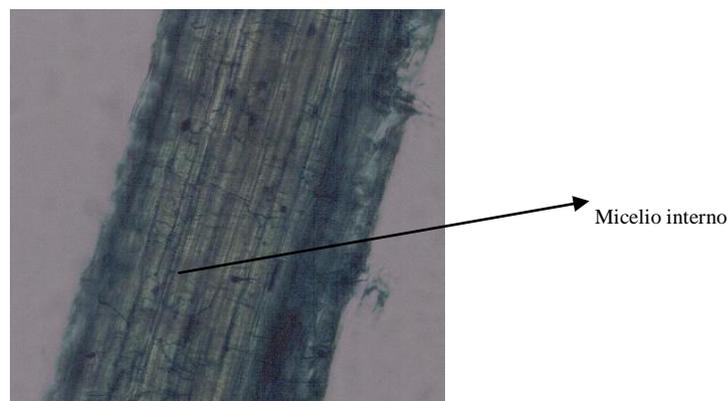


Figura 3.3 Foto de estructuras intraradicales de micorriza arbuscular presente en el interior de una raíz de Avena 40x (Villarroel, 2007).

3.1.2 Helecho

Los datos obtenidos del ensayo de helecho fueron transformados para efectuarse el análisis de varianza. La tabla 3.1 muestra el ADEVA realizado para el factorial AxBxC con dos niveles de arsénico, tres de micorriza y tres de fósforo. Se observa que existe diferencia estadística en la mayoría de tratamientos a excepción de la interacción de arsénico con fósforo.

Tabla 3.3 ADEVA del porcentaje de colonización micorrízica en Helecho

F de V.	GL	SC	CM	F. Cal
TOTAL	56	12034.614	-----	-----
Tratamiento	18	11330.478	629.471	33.970**
As	1	61.359	61.359	3.311*
P	2	211.876	105.938	5.717**
AsxP	2	596.310	298.155	16.090**
M	2	6766.358	3383.179	182.579**
AsxM	2	1813.664	906.832	48.938**
PxM	4	146.550	36.637	1.977 ^{NS}
AsxPxM	4	1037.031	259.257	13.991**
Fact.vs adic	1	697.326	697.326	37.632**
Error Exper.	38	704.136	18.529	-----

En el cuadro 3.4 se muestran los promedios obtenidos de la interacción de micorriza y concentraciones de fósforo que no presentan diferencia estadística, estableciéndose que estos valores e interacciones no muestran efecto sobre el porcentaje de colonización micorrízica.

Cuadro 3.4 Promedio de la colonización micorrízica con respecto a la interacción de fósforo y micorriza en Helecho.

NIVELES DE MICORRIZAxFÓSFORO	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
M1*P0	<i>Pacispora sp.</i> – 0 mg/Kg	27.756
M1*P1	<i>Pacispora sp.</i> – 50 mg/Kg	26.297
M2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg	25.195
M2*P0	<i>G. mosseae</i> - 0 mg/Kg	23.130
M1*P2	<i>Pacispora sp.</i> – 25 mg/Kg	22.387
M2*P2	<i>G. mosseae</i> - 25 mg/Kg	16.207
M0*P0	Sin Micorriza – 0 mg/Kg	0
M0*P1	Sin Micorriza – 50 mg/Kg	0
M0*P2	Sin Micorriza – 25 mg/Kg	0

Los tratamientos que presentan diferencia estadística fueron analizados con la prueba de Tukey al 5% para la determinación de los rangos de significancia lo que se muestra en el cuadro 3.5.

Se identifica que el mejor valor corresponde al tratamiento en donde se tiene el nivel más alto de arsénico junto a la especie 1 (*Pacispora sp.*) y el nivel más bajo de fósforo. Los tratamientos 2 y 3 con mejor respuesta coinciden en presentar la especie 2 (*G. mosseae*) y niveles altos de arsénico, el tratamiento 2 presenta el nivel más bajo de fósforo y el tratamiento 3 el nivel más alto.

Cuadro 3.5 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.

TRATAMIENTOS	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN ARSÉNICO x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
M1*As1*P2	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	49.996	a
M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	34.440	b
M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	31.110	b
M1*As2*P2	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	22.210	c
M1*As2*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	21.116	c
M1*As1*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	21.106	c
M1*As1*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	17.776	c
M1*As2*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	12.220	c
M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	9.996	c
M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	6.663	c
M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	4.440	c
M2*As2*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	3.333	c
M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	0	d
M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	0	d
M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	0	d
M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0	d
M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	0	d
M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	0	d

Los tratamientos que presentan los valores más bajos en cuanto a promedios son aquellos que no tienen inoculación de ninguna de las especies estudiadas sin diferencia con respecto a los niveles de los otros factores como el arsénico y fósforo.

Finalmente, en el cuadro 3.4 se puede observar que se determinaron cuatro grupos de significancia en donde el mejor promedio corresponde al primer rango; los dos tratamientos siguientes que presentan mayores promedios se ubican en un segundo

rango; a partir del cuarto tratamiento se incluye el tercer grupo de significancia que incluye las macetas inoculadas con las micorrizas estudiadas y el último rango se conforma con los tratamientos que no presentaron inoculación.

Como distribución general en los tratamientos, se identifica que existe diferencia en cuanto al porcentaje de colonización con respecto a las especies de micorrizas estudiadas, donde *Pacispora sp* es la que mayor porcentaje presenta, sin embargo se puede ver que los tratamientos con *G. mosseae*, tienen buenos porcentajes de colonización radical como se muestra en la figura 3.4.

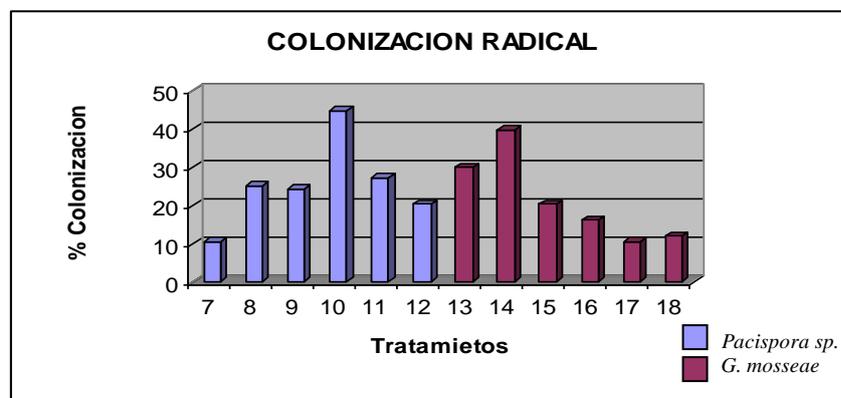


Figura 3.4 Porcentaje de Colonización Micorrízica de *Pacispora sp.* y *Glomus mosseae* en Helecho.

Las interacciones entre los niveles de los factores se puede observar en la figura 3.5. En el caso del gráfico **a.** se determina que la especie de micorriza 1 (*Pacispora sp.*) presenta mayor micorrización en el ensayo de avena. El gráfico **b.** muestra la colonización con respecto a los niveles de fósforo, en donde a diferencia que la avena, existe mayor porcentaje de colonización con niveles altos de fósforo. Con respecto a los niveles de arsénico se aprecia que la micorrización es mayor cuando se desarrolla a mayor concentración de arsénico como se observa en el gráfico **c.**

En el gráfico **d.** existe una mejor infección del hongo en los tratamientos que presentan inoculación de *Pacispora sp.* y un nivel menor de arsénico así como también tratamientos con *G. mosseae* y un nivel mayor de arsénico. Con respecto a la interacción del fósforo con el arsénico en el gráfico **e.** se determina que el mejor tratamiento contiene las mayores concentraciones de arsénico y de fósforo, pero se observa un

comportamiento similar al tener niveles bajos de estos dos factores. En cuanto a la interacción entre fósforo y micorrizas inoculadas mostrado en el gráfico **f.** se tiene que la colonización es mayor en tratamientos que tienen dos comportamientos uno de ellos con la especie *Pacispora sp.* con la menor concentración de fósforo y otro con la especie *G. mosseae* con la concentración mayor de fósforo, por lo que se establece que el nivel de fósforo no influencia en la colonización que presentan las dos especies de micorriza como se corrobora en el análisis de varianza.

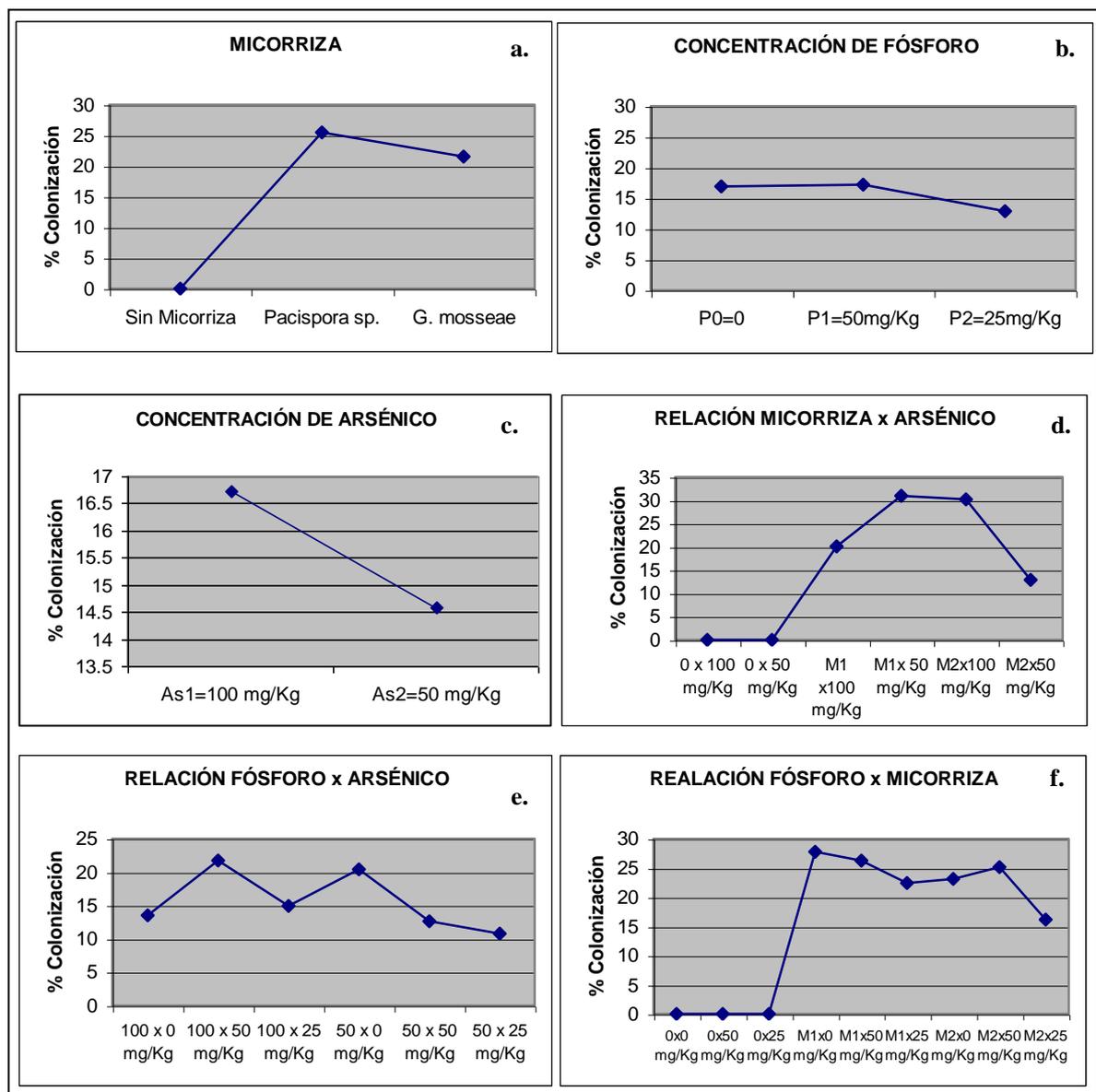


Figura 3.5 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en el porcentaje de colonización micorrízica en Helecho.

En la figura 3.6 se representa una placa de tinción radical de helecho donde se observa claramente las formaciones de vesículas en la raíz del hospedero mostrándose como esferas dentro de la raíz.



Figura 3.6 Estructuras intraradicales de micorriza en Helecho correspondientes a vesículas 40x (Villarroel, 2007).

3.2 BIOMASA AÉREA

3.2.1 Avena

Los datos obtenidos del ensayo de avena fueron recolectados al cabo de los para efectuarse el análisis de varianza según los tratamientos establecidos, los cuales corresponden a la combinación de tres niveles de micorriza, dos de arsénico y tres de fósforo con un control como se muestra a continuación Tabla 3.4:

	Tratamientos	Micorriza x Concentración Arsénico x Concentración Fósforo
Control	M0*As0*P0	Sin Micorriza - 0 mg/Kg – 0 mg/Kg
1	M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg
2	M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 50 mg/Kg
3	M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg
4	M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 0 mg/Kg
5	M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 50 mg/Kg
6	M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg
7	M1*As1*P0	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg
8	M1*As1*P1	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg
9	M1*As1*P2	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg
10	M1*As2*P0	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg – 0 mg/Kg
11	M1*As2*P1	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg
12	M1*As2*P2	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg
13	M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg
14	M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg
15	M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg
16	M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg – 0 mg/Kg
17	M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg – 50 mg/Kg
18	M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg

Se obtuvieron datos sobre el peso seco de las plantas de avena presentes en las macetas de cada tratamiento estos fueron tabulados y se realizó el análisis de varianza que se muestra en la tabla 3.5 en donde se determina que existe diferencia estadística excepto en los valores correspondientes a las concentraciones de fósforo y la interacción de concentraciones de arsénico y fósforo respectivamente.

Tabla 3.5 ADEVA de la biomasa aérea en Avena.

F de V.	GL	SC	CM	F. Cal
TOTAL	56	2.182	-----	-----
Tratamiento	18	1.981	0.110	20.802**
As	1	0.150	0.150	28.479**
P	2	0.013	0.006	1.242 ^{NS}
AsxP	2	0.016	0.008	1.552 ^{NS}
M	2	0.075	0.037	7.155**
AsxC	2	0.111	0.055	10.510**
MxC	4	0.156	0.039	7.403**
AsxMxC	4	0.076	0.019	3.628**
Fact.vs adic	1	1.380	1.380	260.915**
Error Exper.	38	0.201	0.005	-----

El cuadro 3.6 muestra los promedios de los tratamientos que no presentan diferencia estadística, donde se determina un promedio más alto de biomasa aérea en tratamientos que presentan la concentración más alta de fósforo

Cuadro 3.6 Promedio de biomasa aérea al utilizar tres niveles de fósforo en ensayo de Avena.

NIVELES DE FÓSFORO	CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
P2	50 mg/Kg	3.247
P1	25 mg/Kg	3.220
P0	0 mg/Kg	2.638

En el cuadro 3.7 se observan los valores promedios de tratamientos que presentan interacción entre las dos concentraciones de arsénico y tres de fósforo aplicadas. Se determina que existe mayor cantidad de biomasa aérea en las macetas que contenían menor concentración de arsénico y mayor de fósforo. El menor valor de biomasa consecuentemente se presentó en macetas con mayor contenido de arsénico y menor concentración de fósforo.

Cuadro 3.7 Promedio de biomasa aérea en las interacciones entre arsénico y fósforo en ensayo de Avena.

NIVELES DE ARSÉNICO x FÓSFORO	CONCENTRACION ARSÉNICO x CONCENTRACION FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
As2*P2	50 mg/Kg – 25 mg/Kg	0.247
As2*P0	50 mg/Kg – 0 mg/Kg	0.210
As2*P1	50 mg/Kg – 50 mg/Kg	0.207
As1*P1	100 mg/Kg – 50 mg/Kg	0.150
As1*P2	100 mg/Kg – 25 mg/Kg	0.113
As1*P0	100 mg/Kg – 0 mg/Kg	0.082

Los tratamientos que presentan diferencia estadística fueron sometidos a la prueba de Tukey al 5% para identificar los rangos de significancia como se muestra en el cuadro 3.8. Se puede ver que los mejores tratamientos corresponden a los tratamientos que presentan inoculación con *Pacispora sp.* y niveles bajos de arsénico donde el fósforo no es un factor limitante para el desarrollo de biomasa como los factores antes mencionados. Los tratamientos con menor rendimiento en biomasa son los que presentan mayor cantidad de arsénico sin inoculación, con la especie de micorriza 1 *Pacispora sp.* y con la especie 2 *Glomus mosseae*.

Cuadro 3.8 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.

TRATAMIENTOS	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN ARSÉNICO x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
M1*As2*P2	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg	0.459	a
M1*As2*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg – 50 mg/Kg	0.308	b
M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.269	b
M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> – 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.232	b
M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.221	b
M1*As1*P2	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg	0.219	b
M1*As2*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.218	b
M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.190	b
M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	0.168	b
M0*As1*P0	Sin Micorriza – 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.137	b
M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg – 50 mg/Kg	0.114	b
M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	0.113	b
M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.081	b
M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg	0.069	b
M1*As1*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg – 50 mg/Kg	0.068	b
M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.060	b
M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	0.052	b
M1*As1*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg	0.051	b

Se establecieron dos rangos de significancia; el primero, correspondiente al tratamiento con el valor promedio más alto que involucra a la primera especie de micorriza (*Pacispora sp.*) y las concentraciones más bajas de arsénico y de fósforo y el segundo rango conformado por los demás tratamientos establecidos.

La distribución de la biomasa en el ensayo de avena se muestra en la figura 3.7 en donde se muestra el mayor rendimiento en tratamientos con inoculación de *Pacispora sp.* según como se ha registrado en cuadros anteriores.

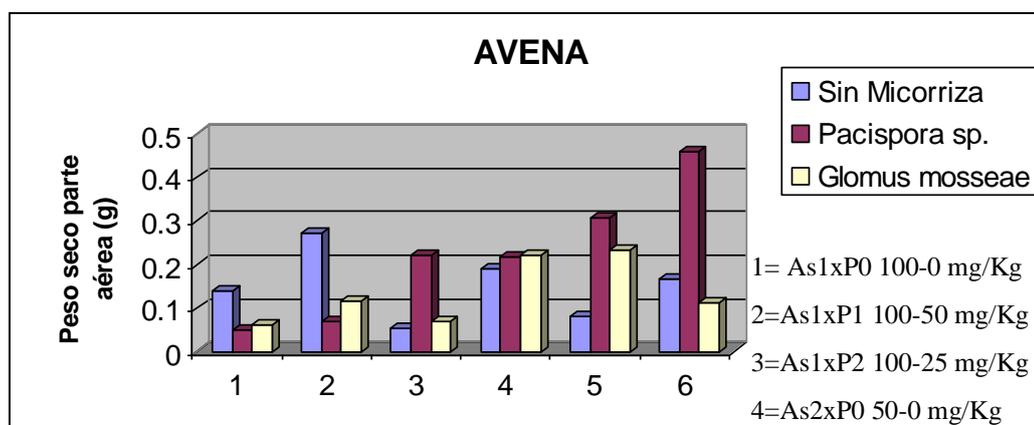


Figura 3.7 Efecto de tratamientos establecidos por combinación de niveles de arsénico, fósforo y micorriza sobre la biomasa aérea en Avena.

Las interacciones que presentan los factores estudiados en la biomasa aérea de avena se muestran en la figura 3.8 y presentan relación con los cuadros nombrados anteriormente.

En el gráfico **a.** se comprueba que los tratamientos inoculados con *Pacispora sp.* presentan un mejor rendimiento de biomasa que las macetas con *G. mosseae* y sin inoculación. El gráfico **b.** indica que la biomasa aérea se ve beneficiada con los dos niveles de fósforo implementados, a diferencia de los tratamientos con un nivel cero de este elemento. En el gráfico **c.** se demuestra que el mayor nivel de arsénico inhibe la formación de biomasa en el ensayo de avena analizado.

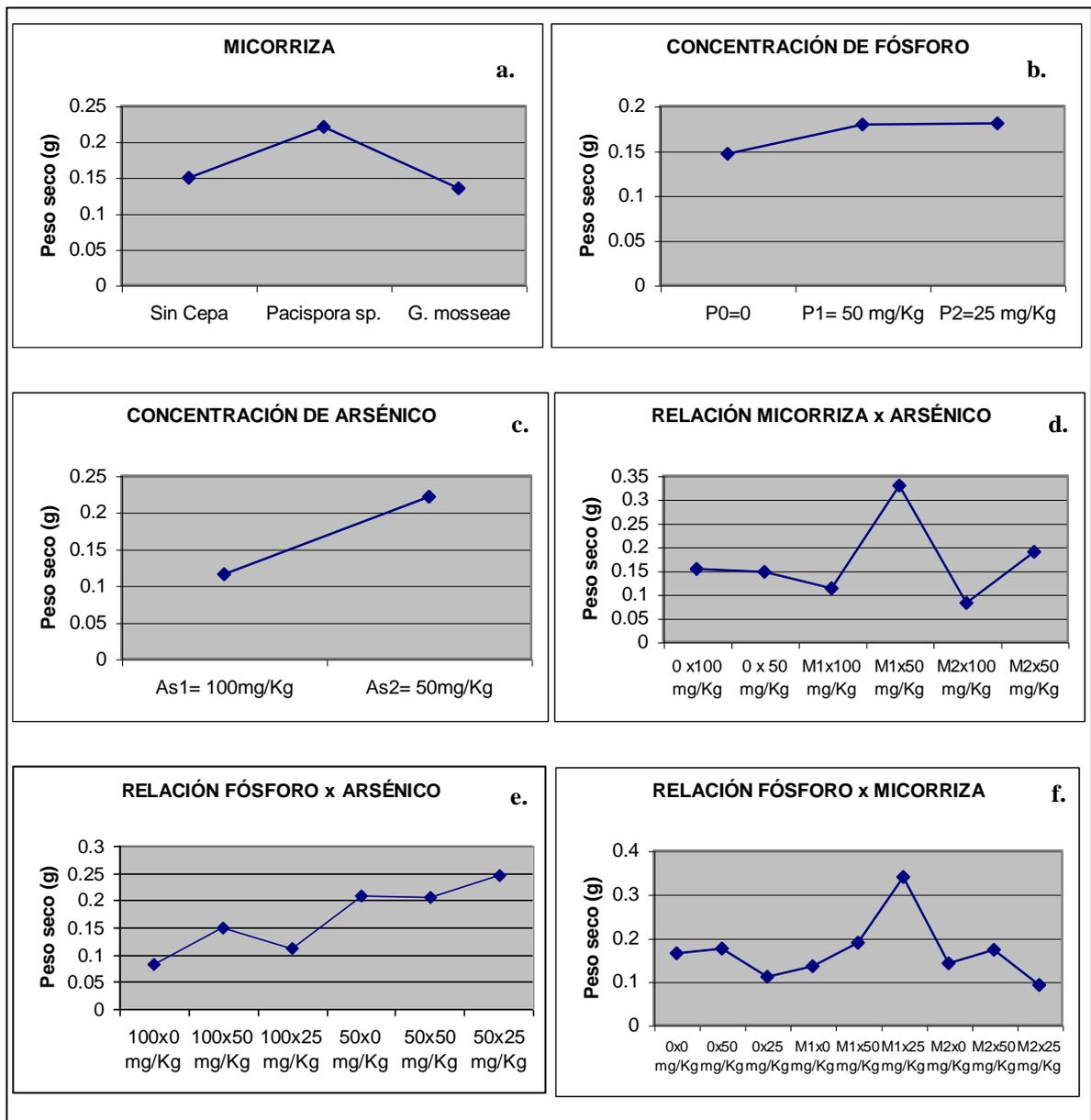


Figura 3.8 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la biomasa aérea en Avena

En el gráfico **d.** se demuestra, en relación a los demás tratamientos de interacción entre micorriza y arsénico, que las macetas con *Pacispora sp.* con un nivel bajo de arsénico tienen un porcentaje más alto de biomasa. En cuanto a la relación de fósforo y arsénico que se muestra en el gráfico **e.** existe un buen rendimiento en tratamientos con bajo nivel de arsénico y el fósforo no presenta influencia de acuerdo a los niveles aplicados, así se observa también en el gráfico **f.** pero se nota la influencia de *Pacispora sp.* en mejorar el rendimiento de biomasa en avena.

3.2.2 Helecho

Los datos obtenidos del peso seco de frondas de helecho de cada tratamiento fueron tabulados y se realizó el análisis de varianza determinándose que existe diferencia estadística entre los tratamientos excepto en la variable de arsénico y en la interacción de los tres factores como se muestra en la tabla 3.6.

Tabla 3.6 ADEVA de la biomasa aérea en Helecho.

F de V.	GL	SC	CM	F. Cal
TOTAL	56	1.190	-----	-----
Tratamiento	18	1.080	0.060	20.690**
As	1	0.001	0.001	0.475 ^{NS}
P	2	0.051	0.025	8.891**
AsxP	2	0.111	0.055	19.189**
M	2	0.355	0.177	61.304**
AsxM	2	0.044	0.022	7.671**
PxM	4	0.233	0.058	20.148**
AsxPxM	4	0.023	0.005	2.028 ^{NS}
Fact.vs adic	1	0.258	0.258	89.133**
Error Exper.	38	0.110	0.002	-----

El cuadro 3.9 muestra el promedio de valores de biomasa en helecho en relación a los niveles de arsénico utilizados en los tratamientos establecidos. Se identifica que en macetas que contenían la menor concentración de arsénico existe mayor biomasa a diferencia de aquellas que presentaron niveles más altos de este elemento.

Cuadro 3.9 Promedio de biomasa aérea al utilizar dos niveles de arsénico en ensayo de Helecho.

NIVELES DE ARSÉNICO	CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO	MEDIA \bar{x}
As2	25 mg/Kg	0.311
As1	50 mg/Kg	0.300

La interacción de los niveles de los factores analizados arsénico, fósforo y tipos de micorrizas presenta una diferencia no significativa por lo que se tiene en el cuadro 3.10 los promedios para los tratamientos establecidos.

Cuadro 3.10 Promedio de biomasa aérea en las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza en Helecho.

TRATAMIENTOS	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN ARSÉNICO x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	0.588
M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	0.492
M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.451
M0*As2*P1	Sin Micorriza – 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.441
M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.348
M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.345
M1*As2*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.326
M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.322
M0*As2*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	0.309
M1*As1*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.291
M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.274
M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.251
M1*As1*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.223
M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.204
M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	0.203
M1*As1*P2	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	0.176
M1*As2*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.145
M1*As2*P2	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	0.102

Se identifica que el mejor tratamiento corresponde al que presenta inoculación con *G. mosseae* y con una concentración alta de arsénico y baja de fósforo. Como segundo mejor promedio se encuentra el tratamiento que presenta también inoculación con *G. mosseae* pero en este caso se tienen una concentración menor de arsénico y baja de fósforo. Consecuentemente como el tratamiento con menor promedio se tienen el que presenta *Pacispora sp.* con una concentración baja tanto de arsénico como de fósforo.

La distribución de los valores de biomasa aérea en helecho se muestra en la figura 3.9 en donde se identifica la mayor contribución de la especie de micorriza 2 (*G. mosseae*) con respecto a la especie 1 (*Pacispora sp.*) coincidiendo con los datos obtenidos en el análisis de varianza.

Es importante señalar que en el ensayo de helecho se observó gran cantidad de biomasa en las macetas que no presentaron inoculación especialmente cuando se aplicó una concentración menor de arsénico y mayor de fósforo donde se tuvo valores casi iguales a los obtenidos en macetas con inoculación de *G. mosseae*.

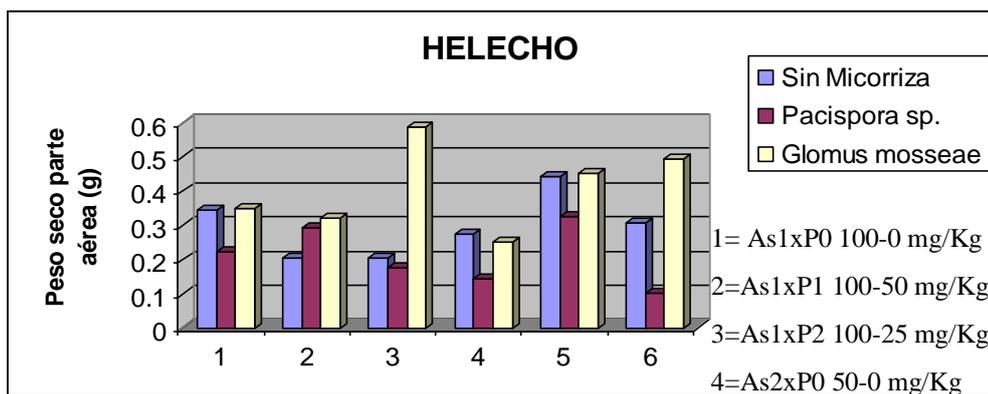


Figura 3.9 Efecto de tratamientos establecidos por combinación de niveles de arsénico, fósforo y micorriza sobre la biomasa aérea en Helecho.

Las interacciones presentadas en el ensayo de helecho con respecto a la biomasa aérea de las plantas analizadas se presentan en la figura 3. 10. En donde en el gráfico **a.** se muestra que los tratamientos inoculados con *G. mosseae* presentan un mejor rendimiento de biomasa a diferencia del ensayo de avena en donde *Pacispora sp.* era la especie que mejor rendimiento presentaba.

El gráfico **b.** se muestra que la biomasa aérea no se ve influenciada determinadamente por la concentración de fósforo ya que no se presenta una diferencia marcada sin embargo, es notorio que con la mayor concentración de este elemento se tiene mayor biomasa. En el caso de la concentración de arsénico coincide con lo observado en avena, porque se tiene mayor biomasa cuando el nivel de arsénico es el menor según como se muestra en el gráfico **c.**

En el gráfico **d.** se muestra el efecto de la especie *G. mosseae* frente a *Pacispora sp.* y a la ausencia de inoculación, en donde se identifica que existe mayor biomasa de helecho con la micorriza 2 sin tener efecto directo las concentraciones de arsénico. En el gráfico **e.** se muestra la influencia de la interacción de concentraciones de arsénico y fósforo determinándose que cuando existe menor cantidad de arsénico y mayor de fósforo existe mejor rendimiento de biomasa. Finalmente en el gráfico **f.** se evidencia la relación de la micorriza con mejor rendimiento *G. mosseae* con los distintos niveles de fósforo teniendo alto porcentaje de biomasa con niveles altos y bajos de este elemento.

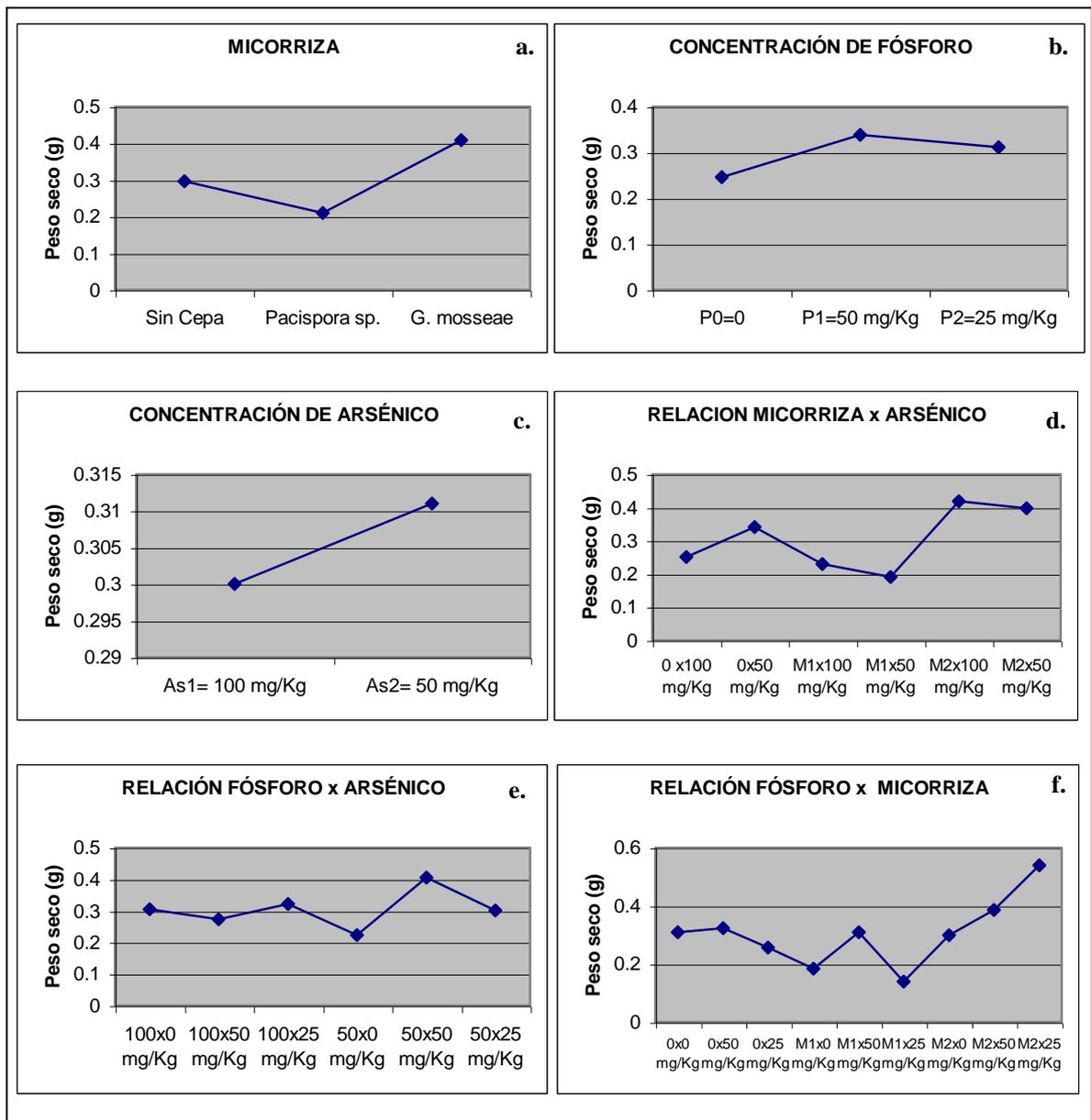


Figura 3.10 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en el porcentaje de colonización micorrízica en ensayo de Helecho.

3.3 CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO

3.3.1 Avena

La concentración de arsénico presente en las hojas de avena fue establecida a partir de las muestras tomadas de los tratamientos por la combinación de tres niveles de

micorriza, dos de arsénico y tres de fósforo con un control como se muestra en la tabla 3.7:

Tabla 3.7 Tabla de Tratamientos establecidos para el factorial de tres niveles de micorriza por dos niveles de arsénico y por tres niveles de fósforo.

	Tratamientos	Micorriza x Concentración de Arsénico x Concentración de Fósforo
Control	M0*As0*P0	Sin Micorriza - 0 mg/Kg - 0 mg/Kg
1	M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg
2	M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg
3	M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg
4	M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg
5	M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg
6	M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg
7	M1*As1*P0	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg
8	M1*As1*P1	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg
9	M1*As1*P2	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg
10	M1*As2*P0	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg
11	M1*As2*P1	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg
12	M1*As2*P2	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg
13	M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg
14	M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg
15	M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg
16	M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg
17	M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg
18	M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg

Los datos de concentración de arsénico en avena fueron tabulados y se realizó el análisis de varianza según como se muestra en la tabla 3.8.

Tabla 3.8 ADEVA concentración de Arsénico en Avena

F de V.	GL	SC	CM	F. Cal
TOTAL	56	3145212.400	-----	-----
Tratamiento	18	3095828.290	171990.461	299678.456**
As	1	645950.157	645950.157	1125512.110**
P	2	83235.880	41617.940	72515.649**
AsxP	2	88151.376	44075.688	76798.062**
M	2	213228.173	106614.087	185765.796**
AsxM	2	234904.087	117452.043	204649.995**
PxM	4	953575.486	238393.872	415380.639**
AsxPxM	4	876783.132	219195.783	381929.635**
Fact.vs adic	1	49363.401	49363.401	86011.443**
Error Exper.	36	20.661	0.573	-----

Como se muestra todos los tratamientos presentan alta diferencia estadística, por lo que fueron sometidos a la prueba de Tukey al 5% para la determinación de los rangos de significancia lo que se muestra en el cuadro 3.11. Se demuestra la diferencia marcada entre tratamientos obteniéndose varios rangos de significancia.

Se identifica que el mejor valor corresponden al tratamiento que presenta la micorriza 1 *Pacispora sp.* el nivel más alto de arsénico y el nivel más bajo de fósforo. El segundo tratamiento con buen rendimiento no presenta inoculación y tiene los niveles más altos de arsénico y fósforo. El tercer tratamiento presenta *Pacispora sp.* con la concentración más alta de arsénico y la menor de fósforo.

El tratamiento con el valor más bajo en cuanto a la concentración de arsénico en hojas es el inoculado con *Pacispora sp.* con alto nivel de arsénico y de fósforo, como se observa este valor difiere mucho de la distribución normal de los demás tratamientos presentando un promedio muy bajo.

Cuadro 3.11 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.

TRATAMIENTOS	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN ARSÉNICO x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}	RANGOS SIGNIFICANCIA	DE
M1*As1*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	985.00	a	
M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	492.01	b	
M1*As1*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	298.60	c	
M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	235.60	d	
M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	125.60	e	
M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	56.01	f	
M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	44.41	g	
M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	44.03	g	
M1*As2*P0	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	41.39	h	
M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	40.19	h	
M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	32.84	i	
M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	31.22	j	
M1*As2*P1	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	29.56	k	
M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	23.66	l	
M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	17.66	m	
M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	17.06	m	
M1*As2*P2	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	14.51	n	
M0*As0*P0	Sin Micorriza - 0 mg/Kg - 0 mg/Kg	8.74	o	
M1*As1*P2	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.21	p	

La distribución, en forma general, de la concentración de arsénico en el ensayo de avena muestra que existe el pico más alto con inoculación de la especie de micorriza 1 *Pacispora sp.* y en concordancia con el nivel más alto de arsénico sin adición de fósforo. Se observa también dos picos menores, uno correspondiente a tratamientos sin inoculación y otro con *G. mosseae* ambos con los mayores niveles de arsénico (Figura 3.11).

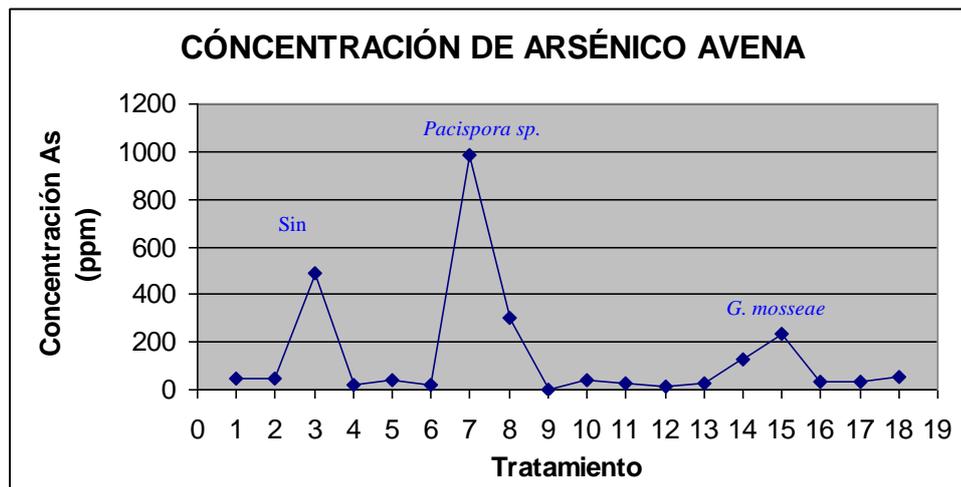


Figura 3.11 Concentración de arsénico en hojas de Avena medida por espectrofotometría de absorción atómica.

Como se puede observar en la figura 3.12, las interacciones de los factores estudiados presentan influencia en la cantidad de arsénico absorbida por el ensayo de avena. En el caso del gráfico **a.** se presenta la correspondencia de encontrar una concentración mayor de arsénico en hojas, en los tratamientos que contenían un mayor nivel de este elemento. El gráfico **b.** muestra que la absorción de arsénico fue mayor en macetas inoculadas con la primera especie *Pacispora sp.* y menor con *G. mosseae* igual que en las macetas sin inoculación.

El gráfico **c.** presenta la relación de la absorción de arsénico mediada por los niveles de fósforo, determinándose que existe mayor toma de arsénico por la planta cuando no se adicionó fósforo. En el gráfico **d.** se muestra el efecto que tiene *Pacispora sp.* en el aumento de concentración de arsénico en hojas de avena, en donde se observa un pico alto en tratamientos con inoculación de la micorriza nombrada y que presentan alta concentración de arsénico.

En el gráfico e. se muestra la influencia de la interacción de concentraciones de arsénico y fósforo determinándose que en macetas con alto nivel de arsénico y bajo de fósforo existe mayor presencia de arsénico en hojas.

En el gráfico f. se observa la influencia de la relación de las micorrizas con las distintas concentraciones de fósforo en la concentración de arsénico absorbida por avena, teniendo el mayor contenido de este elemento en tratamientos con *Pacispora sp.* y niveles bajos de fósforo.

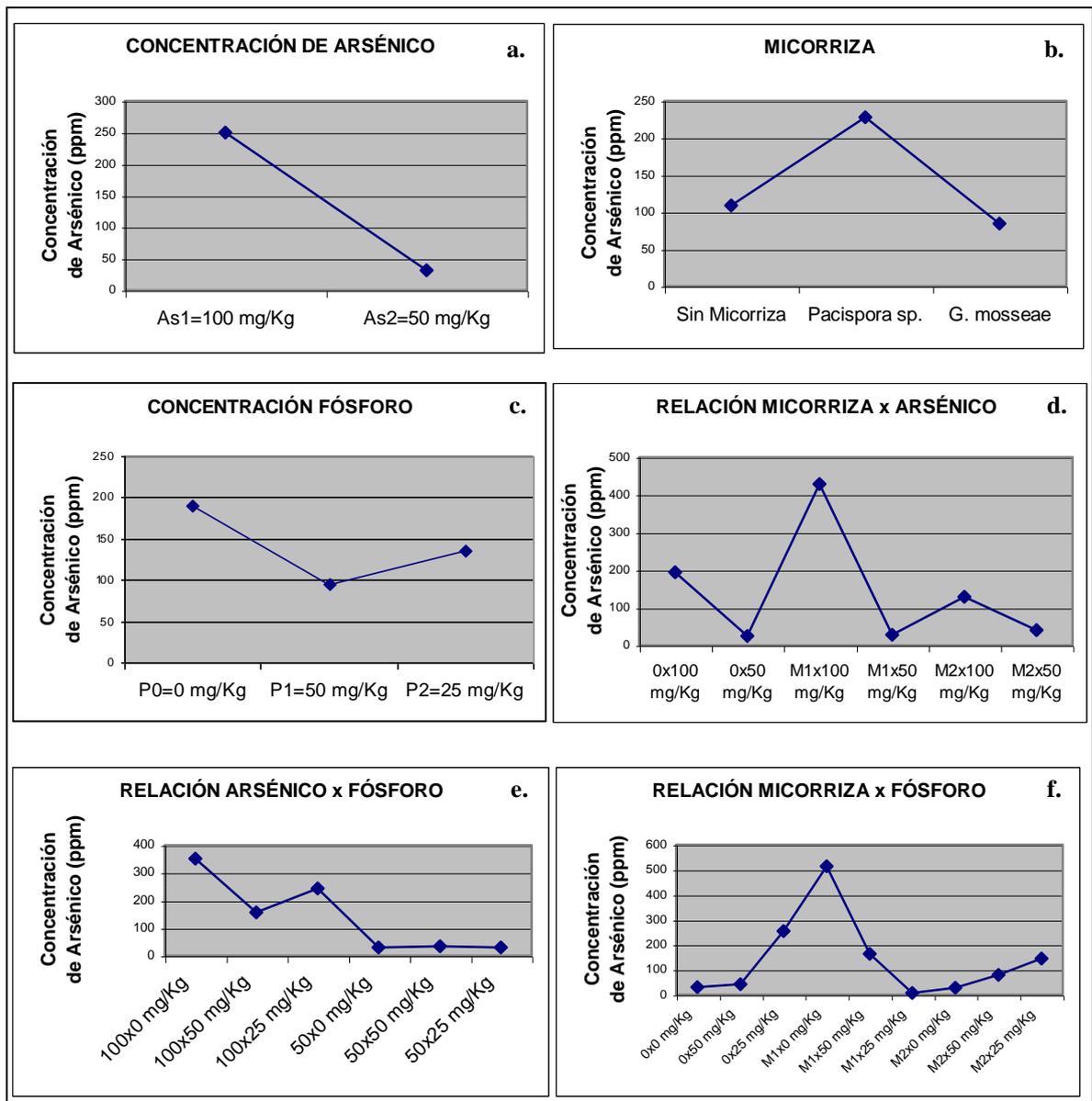


Figura 3.12 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la concentración de arsénico en Avena.

3.3.2 Helecho

Los valores de la concentración de arsénico contenida en frondas de helecho fueron tabulados y se realizó el análisis de varianza, según como se muestra en la tabla 3.9, todos los tratamientos tienen diferencia estadística.

Tabla 3.9 ADEVA concentración de Arsénico en Helecho.

F de V.	GL	SC	CM	F. Cal
TOTAL	56	4720.44758	-----	-----
Tratamiento	18	4720.15908	262.231	34540.844**
As	1	1226.21557	1226.215	161516.036**
P	2	552.862516	276.431	36411.281**
AsxP	2	420.521318	210.260	27695.348**
M	2	1076.70031	538.350	70911.008**
AsxM	2	1104.81407	552.407	72762.568**
PxM	4	127.506563	31.876	4198.763**
AsxPxM	4	182.387721	45.596	6005.987**
Fact.vs adic	1	29.1510091	29.151	3839.745**
Error Exper.	38	0.28849267	0.007	-----

El promedio de los tratamientos fueron analizados con la prueba de Tukey al 5% para la determinación de los rangos de significancia lo que se muestra en el cuadro 3.12. Se observa que el mejor valor corresponde al tratamiento que presenta la especie de micorriza 1 *Pacispora sp.* con el nivel más alto de arsénico y de fósforo. El segundo tratamiento con promedio alto se asemeja al primero al presentar *Pacispora sp.* y el nivel más alto de arsénico pero en este caso presenta un nivel bajo de fósforo.

Con respecto a los tratamientos con valores más bajos se encuentran macetas sin inoculación, uno con un nivel alto de arsénico y otro con nivel bajo. Se establece que el valor menor corresponde al tratamiento con *Pacispora sp.*, un nivel bajo de arsénico y de fósforo.

Como se observa, existe gran diferencia estadística entre los tratamientos por lo que existen varios rangos de significancia en donde la mayoría pertenecen a un grupo diferente, a excepción de los tratamientos correspondientes a los valores de 1.456 y 1.427, así como los tres últimos valores.

Cuadro 3.12 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.

TRATAMIENTOS	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN ARSÉNICO x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
M1*As1*P2	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	34.360	A
M1*As1*P1	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	22.100	B
M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	19.336	C
M1*As1*P0	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	17.283	D
M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	7.810	E
M1*As2*P1	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	5.462	f
M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	5.093	g
M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	4.933	h
M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	3.891	i
M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	2.743	j
M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	2.153	k
M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	1.456	l
M1*As2*P2	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	1.427	l
M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	1.170	m
M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.846	n
M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.390	o
M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	0.266	o
M1*As2*P0	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	0.243	o

La distribución de la concentración de arsénico según los tratamientos aplicados se representa en la figura 3.13, concordando con el cuadro de promedios anteriormente explicado. Se puede ver que al igual que el ensayo de avena, los tratamientos inoculados con *Pacispora sp.* presentan mayor concentración de arsénico. Se muestra también un pico considerable con los tratamientos inoculados con *G. mosseae*.

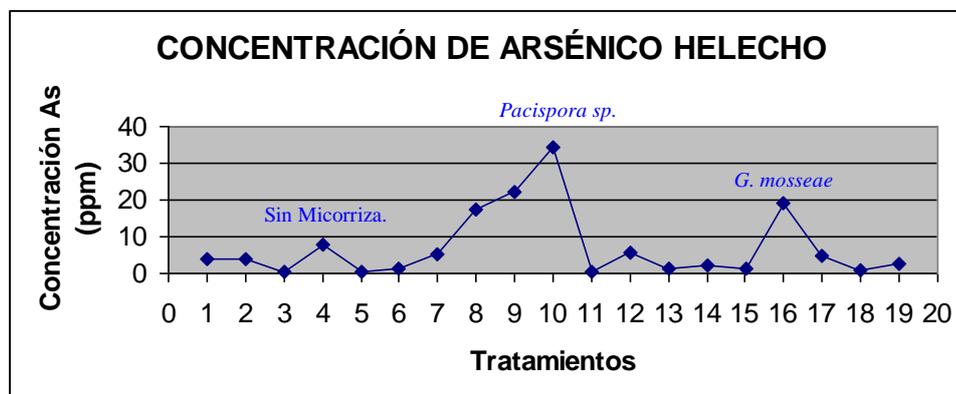


Figura 3.13 Concentración de arsénico en hojas de Helecho medida por espectrofotometría de absorción atómica.

La influencia de las interacciones de los factores estudiados en la cantidad de arsénico presente en frondas de helecho se muestra en la figura 3.14. En el gráfico **a.** se indica la relación directa entre los niveles de arsénico administrados y la concentración de arsénico en frondas. El gráfico **b.** muestra el comportamiento similar al ensayo de avena en donde la absorción de arsénico es mayor en macetas inoculadas con la primera especie de micorriza *Pacispora sp.* y menor con la especie 2 *G. mosseae* igual que sin inoculación. El gráfico **c.** presenta la relación de la absorción de arsénico mediada por los niveles de fósforo, se muestra que existe mayor toma de arsénico por la planta con niveles bajos de fósforo.

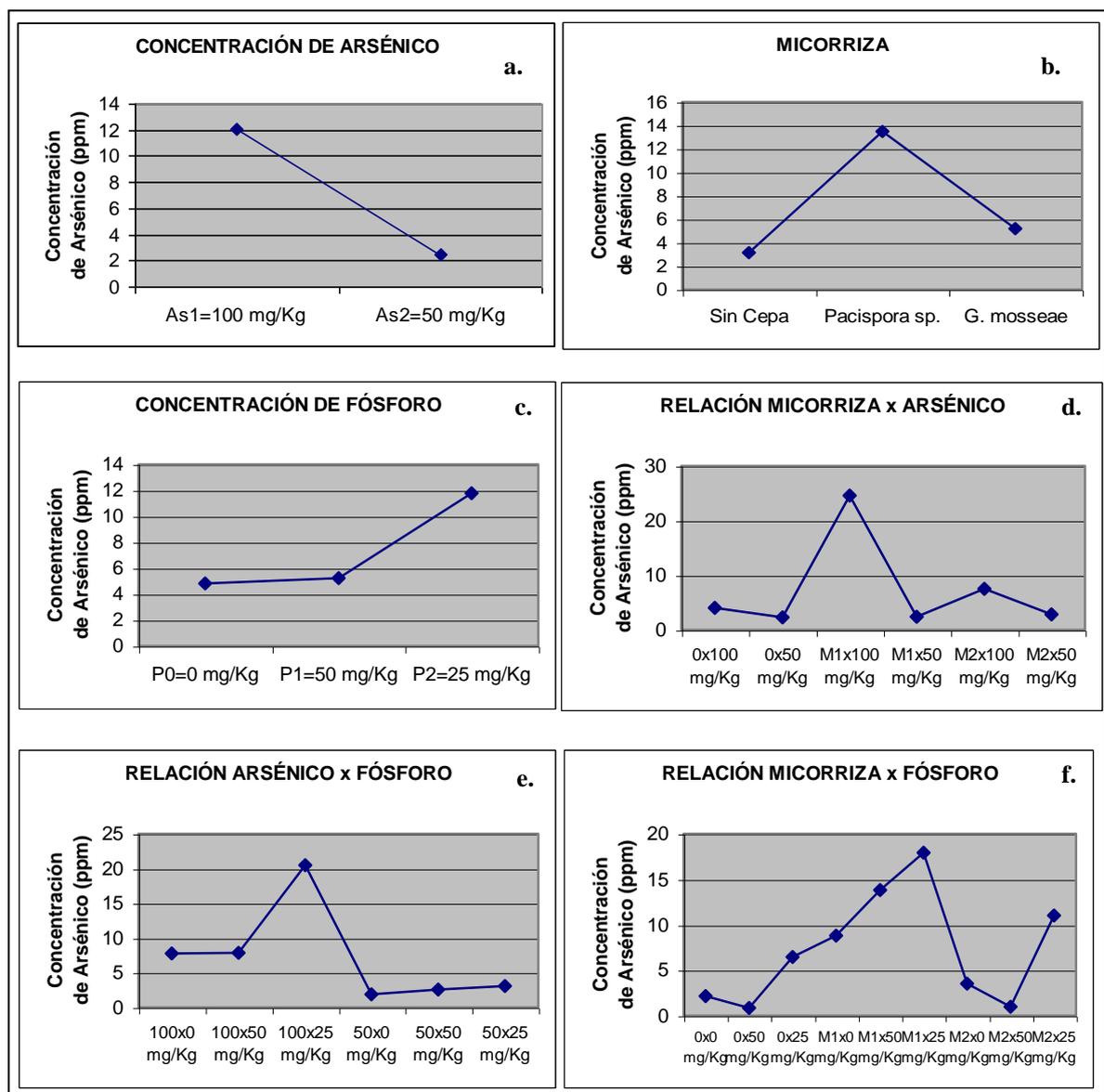


Figura 3.14 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la concentración de arsénico en Helecho.

En el gráfico **d.** se muestra la relación entre micorriza y concentraciones de arsénico con respecto a la absorción de este elemento en helecho, en donde se identifica que tratamientos que presentan inoculación con *Pacispora sp.* y una mayor concentración de arsénico tienen mayor absorción. Referente a la relación entre arsénico y fósforo se tiene mayor absorción de arsénico en tratamientos con alta concentración de este elemento y menor de fósforo como se muestra en gráfico **e.** y finalmente se muestra la influencia de la variable analizada por la relación entre micorriza y concentración de fósforo en el gráfico **f.** en donde se tiene una alta concentración de arsénico en hojas de helecho en tratamientos con la especie de micorriza 1 y la menor concentración de fósforo como ya se ha descrito anteriormente.

3.4 CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO

3.4.1 Avena

En el ensayo de avena se tabularon los datos de acuerdo a los tratamientos establecidos como se muestra a continuación Tabla 3.10:

Tabla 3.10 Tabla de Tratamientos establecidos para el factorial de tres niveles de micorriza por dos niveles de arsénico y por tres niveles de fósforo.

	Tratamientos	Micorriza x Concentración de Arsénico x Concentración de Fósforo
Control	M0*As0*P0	Sin Micorriza - 0 mg/Kg - 0 mg/Kg
1	M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg
2	M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 50 mg/Kg
3	M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg
4	M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 0 mg/Kg
5	M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 50 mg/Kg
6	M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg
7	M1*As1*P0	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg
8	M1*As1*P1	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg
9	M1*As1*P2	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg
10	M1*As2*P0	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg
11	M1*As2*P1	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg – 50 mg/Kg
12	M1*As2*P2	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg
13	M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg
14	M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg – 50 mg/Kg
15	M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg
16	M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg
17	M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg – 50 mg/Kg
18	M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg

Los datos de concentración de fósforo en hojas de avena se tabularon para realizar el análisis de varianza como se indica en la tabla 3.11. Los tratamientos estudiados presentan alta diferencia estadística al 1% a excepción del factor arsénico que presenta diferencia estadística al 5%. Esto determina la influencia de los niveles de los factores sobre la cantidad de fósforo en hojas de avena.

Tabla 3.11 ADEVA concentración de fósforo en Avena.

F de V.	GL	SC	CM	F. Cal
TOTAL	56	19191002	-----	-----
Tratamiento	18	18866184.3	1048121.348	122.618**
As	1	993622.685	993622.685	116.242**
P	2	49068.287	24534.143	2.870*
AsxP	2	6393130.79	3196565.394	373.962**
M	2	408981.481	204490.740	23.923**
AsxM	2	1275162.04	637581.018	74.589**
PxM	4	4851087.96	1212771.991	141.880**
AsxPxM	4	3276053.24	819013.310	95.815**
Fact.vs adic	1	1619077.78	1619077.784	189.413**
Error Exper.	38	324817.708	8547.834	-----

El promedio de los tratamientos fueron analizados con la prueba de Tukey al 5% para la determinación de los rangos de significancia lo que se muestra en el cuadro 3.13. Se observa que el mejor valor corresponde al tratamiento que presenta la especie de micorriza 1 *Pacispora sp.* con el nivel más alto de arsénico y de fósforo. El segundo tratamiento con alto promedio se asemeja al primero al presentar *Pacispora sp.* y el nivel más alto de arsénico pero en este caso presenta un nivel bajo de fósforo.

Con respecto a los tratamientos con valores menores se encuentran macetas sin inoculación uno de ellos con un nivel mayor de arsénico y otro con nivel bajo. Se establece que el valor menor corresponde al tratamiento con *Pacispora sp.* con un nivel bajo de arsénico y de fósforo.

De acuerdo a la prueba aplicada se establecieron cuatro rangos de significancia los dos mejores tratamientos corresponden a los dos primeros rangos, los cuatro siguientes tratamientos se agrupan en el tercer rango, los tratamientos siguientes pertenecen al cuarto grupo a excepción de los tres últimos que forman el ultimo rango.

Cuadro 3.13 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza.

TRATAMIENTOS	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN ARSÉNICO x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg – 50 mg/Kg	6154.16	a
M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg	5637.50	b
M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg	5541.66	c
M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg	5520.83	c
M1*As2*P2	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg	5466.66	c
M1*As1*P0	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg – 0 mg/Kg	5404.16	c
M1*As1*P1	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg – 50 mg/Kg	5170.83	d
M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 50 mg/Kg	5000	d
M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg – 50 mg/Kg	4816.66	d
M1*As1*P2	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	4795.83	d
M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 25 mg/Kg	4766.66	d
M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg – 0 mg/Kg	4683.33	d
M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg – 25 mg/Kg	4604.16	d
M1*As2*P1	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	4579.16	d
M1*As2*P0	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg – 0 mg/Kg	4525.00	d
M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	4262.50	e
M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg – 0 mg/Kg	4091.66	e
M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg – 50 mg/Kg	4037.50	e

La distribución de la concentración de arsénico según los tratamientos aplicados se representa en la figura 3.15, concordando con el cuadro de promedios anteriormente explicado. Se muestra un comportamiento homogéneo sin presentar picos altos o valores considerablemente altos.

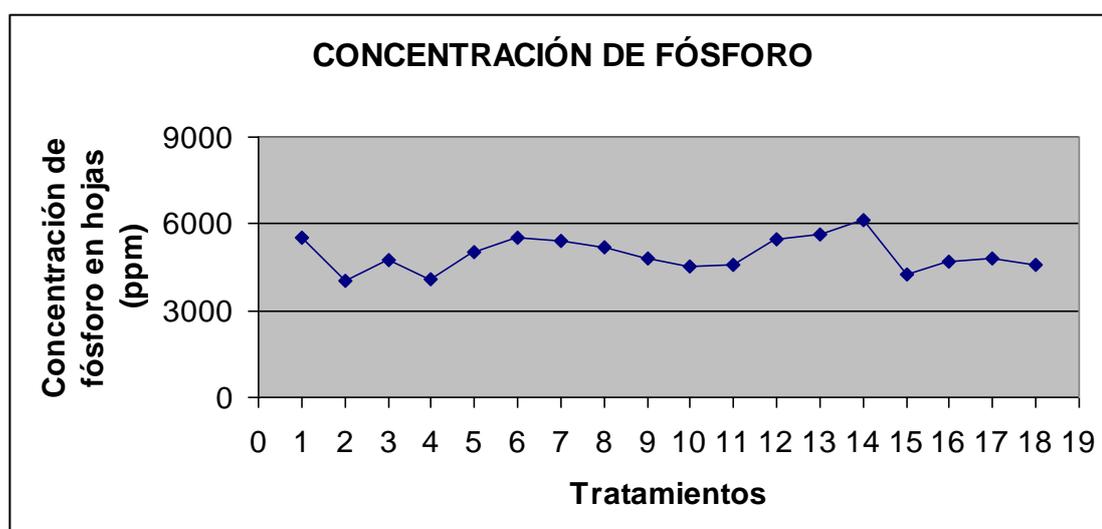


Figura 3.15 Concentración de fósforo en hojas de Avena medida por espectrofotometría UV.

En la figura 3.16 se muestra las interacciones de los factores estudiados y su influencia en la cantidad de arsénico presente en frondas de helecho. En el gráfico **a.** se presenta la relación entre los niveles de arsénico administrados y la concentración de fósforo absorbida por las plantas en donde se tiene que a menor cantidad de arsénico mayor fósforo. El gráfico **b.** muestra que la mayor concentración de fósforo se obtiene con la aplicación de *Pacispora sp.* con respecto a la especie *G. mosseae*. El gráfico **c.** presenta la relación de la absorción de arsénico mediada por los niveles de fósforo, donde se tiene relación con el mayor nivel mayor concentración presente.

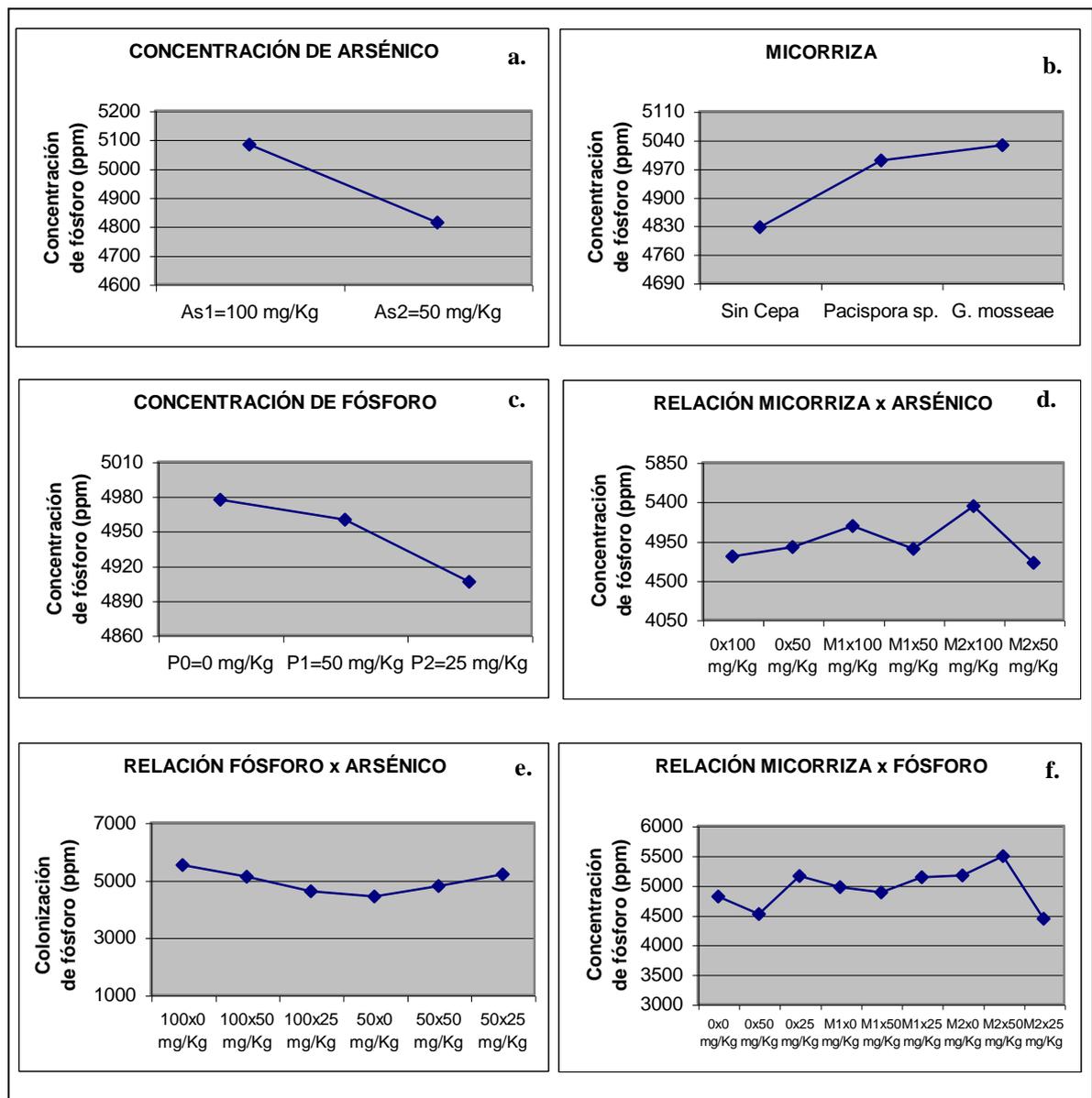


Figura 3.16 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la concentración de fósforo en Avena.

En el gráfico **d.**, se puede observar la relación del arsénico y micorriza con respecto a la absorción de fósforo, se tiene un pico alto en un tratamiento con *G. mosseae* con alto nivel de arsénico. En el gráfico **e.** se muestra la relación entre arsénico y fósforo donde se nota la competencia existente entre estos elementos en la planta a mayores niveles de arsénico menores concentraciones de fósforo. En el gráfico **f.** se muestra la relación entre la micorriza y el fósforo determinando un pico alto en tratamientos con *G. mosseae* y niveles altos de fósforo.

3.4.2 Helecho

Los datos de concentración de fósforo en hojas de helecho se tabularon y se realizaron el análisis de varianza para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos como se indica en la tabla 3.12. Se observa que existen algunos valores con una diferencia no significativa como en el factor micorriza, la relación de arsénico y fósforo y la relación de fósforo con micorriza.

Tabla 3.12 ADEVA concentración de fósforo en Helecho.

F de V.	GL	SC	CM	F. Cal
TOTAL	56	56489638.4	-----	-----
Tratamiento	18	31568771.8	1753820.66	2.67**
As	1	8948119.23	8948119.23	13.64**
P	2	5395668.13	2697834.07	4.11**
AsxP	2	870087.668	435043.834	0.66 ^{NS}
M	2	595614.439	297807.219	0.45 ^{NS}
AsxM	2	2342755.74	1171377.87	1.782 ^{NS}
PxM	4	5297375	1324343.75	2.01 ^{NS}
AsxPxM	4	7773937.02	1943484.26	2.96**
Fact.vs adic	1	345214.57	345214.57	0.52 ^{NS}
Error Exper.	38	24920866.6	655812.278	-----

En los siguientes cuadros se indican los promedios de los tratamientos que no presentan diferencias estadísticas. Como en el cuadro 3.14 se presenta la relación entre las concentraciones de arsénico y las de fósforo, determinándose que el mejor valor corresponde para los tratamientos que presentan menor cantidad tanto de arsénico como de fósforo.

El siguiente valor con un promedio alto pertenece a los tratamientos que tienen una concentración baja de arsénico y alta de fósforo. Finalmente se observa que

congruentemente que la relación con menor promedio es la que presenta nivel alto de arsénico y bajo de fósforo.

Cuadro 3.14 Promedio de concentración de fósforo de la interacción entre arsénico y fósforo en Helecho.

NIVELES DE ARSÉNICO x FÓSFORO	CONCENTRACIÓN ARSÉNICO x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
As2*P0	50 mg/Kg – 0 mg/Kg	3826.669
As2*P1	50 mg/Kg – 50 mg/Kg	2949.368
As2*P2	50 mg/Kg – 25 mg/Kg	2871.377
As1*P0	100 mg/Kg – 0 mg/Kg	2665.852
As1*P1	100 mg/Kg - 50 mg/Kg	2389.422
As1*P2	100 mg/Kg - 25 mg/Kg	2149.720

El cuadro 3.15 presenta los promedios de valores de fósforo en helecho con respecto a los tipos de micorrizas que se han inoculado. El valor más alto corresponde a la micorriza 1 *Pacispora sp.* que se impone a *G. mosseae* y a los tratamientos que no presentan ninguna especie de micorriza.

Cuadro 3.15 Promedio de concentración de fósforo al utilizar tres niveles de micorriza en Helecho.

NIVELES DE MICORRIZA	MICORRIZA INOCULADA	MEDIA \bar{x}
M1	<i>Pacispora sp.</i>	2950.759
M2	<i>G. mosseae</i>	2775.361
M0	Sin Micorriza	2700.084

Con respecto al cuadro 3.16 se puede ver los promedios de fósforo en helecho de acuerdo al efecto que tiene sobre esta variable la relación de arsénico y micorrizas. Se tiene como mejor valor a la relación arsénico sin inoculación como según promedio esta *Pacispora sp.* con una concentración baja de arsénico y el menor promedio corresponde a la relación de una concentración alta de arsénico sin micorriza inoculada.

Cuadro 3.16 Promedio de concentración de fósforo de la interacción entre arsénico y micorriza en Helecho.

NIVELES DE ARSÉNICO x MICORRIZA	MICORRIZA INOCULADA x CONCENTRACIÓN ARSÉNICO	MEDIA \bar{x}
M0*As2	Sin Micorriza – 50 mg/Kg	3367.228
M1*As2	<i>Pacispora sp.</i> – 50 mg/Kg	3347.575
M2*As2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg	2932.611
M2*As1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg	2618.110
M1*As1	<i>Pacispora sp.</i> – 100 mg/Kg	2553.943
M0*As1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg	2032.941

El cuadro 3.17 presenta la interacción de las especies de micorrizas con las concentraciones de fósforo y los promedios obtenidos. Se identifica que el mejor valor se tiene en tratamientos con *Pacispora sp.* y con el nivel más bajo de fósforo, seguido de este se tiene el promedio de la interacción entre *G. mosseae* y el nivel más bajo de fósforo. Como menor valor se identifica el promedio de la relación de *Pacispora sp.* y una concentración baja de fósforo.

Cuadro 3.17 Promedio de concentración de fósforo de la interacción entre fósforo y micorriza en Helecho.

NIVELES DE FÓSFORO x MICORRIZA	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
M1*P0	<i>Pacispora sp.</i> - 0 mg/Kg	3744.791
M2*P0	<i>G. mosseae</i> - 0 mg/Kg	3465.676
M0*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg	2868.487
M1*P1	<i>Pacispora sp.</i> - 50 mg/Kg	2730.999
M0*P2	Sin Micorriza - 25 mg/Kg	2703.452
M0*P0	Sin Micorriza - 0 mg/Kg	2528.314
M2*P2	<i>G. mosseae</i> - 25 mg/Kg	2451.706
M2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg	2408.699
M1*P2	<i>Pacispora sp.</i> - 25 mg/Kg	2376.488

El cuadro 3.18 presenta los promedios obtenidos del factorial versus el adicional en donde se muestra que el mejor tratamiento corresponde a *Pacispora sp.* con la concentración más baja de arsénico y de fósforo.

El adicional o control muestra un promedio sobre los tratamientos que presentan alta concentración de arsénico lo que soporta los resultados ya nombrados anteriormente

en donde se establece que altas concentraciones de arsénico disminuye la absorción de fósforo.

Los promedios con menor valor corresponden a los tratamientos compuestos por *Pacispora sp.* con la concentración más alta de arsénico y una baja concentración de fósforo, así como el tratamiento que no presentó inoculación con la concentración más alta de arsénico y la menor de fósforo.

Cuadro 3.18 Promedio de concentración de fósforo de las interacciones entre arsénico, fósforo y micorriza en Helecho.

TRATAMIENTOS	MICORRIZA x CONCENTRACIÓN ARSÉNICO x CONCENTRACIÓN FÓSFORO	MEDIA \bar{x}
M1*As2*P0	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	4177.083
M0*As2*P0	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	3714.962
M2*As2*P0	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 0 mg/Kg	3587.962
M0*As2*P1	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	3460.585
M1*As2*P2	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	3375.00
M2*As1*P0	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	3343.390
M1*As1*P0	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	3312.500
M1*As1*P1	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	2971.354
M0*As2*P2	Sin Micorriza - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	2926.136
M2*As2*P1	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	2896.875
M2*As1*P2	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	2590.416
M1*As2*P1	<i>Pacispora sp</i> - 50 mg/Kg - 50 mg/Kg	2490.644
M0*As1*P2	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	2480.769
M0*As0*P0	Sin Micorriza - 0 mg/Kg - 0 mg/Kg	2460.217
M2*As2*P2	<i>G. mosseae</i> - 50 mg/Kg - 25 mg/Kg	2312.996
M0*As1*P1	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	2276.388
M2*As1*P1	<i>G. mosseae</i> - 100 mg/Kg - 50 mg/Kg	1920.524
M1*As1*P2	<i>Pacispora sp</i> - 100 mg/Kg - 25 mg/Kg	1377.976
M0*As1*P0	Sin Micorriza - 100 mg/Kg - 0 mg/Kg	1341.666

De manera general la concentración de fósforo de acuerdo a los tratamientos establecidos se muestra en la figura 3.17 en donde se observa una tendencia homogénea sin picos altos en donde se establece como mejor tratamiento al que presenta *Pacispora sp.* con un nivel bajo de arsénico y actuando como el peor promedio se tiene el tratamiento que no presenta inoculación con una alta concentración de arsénico.

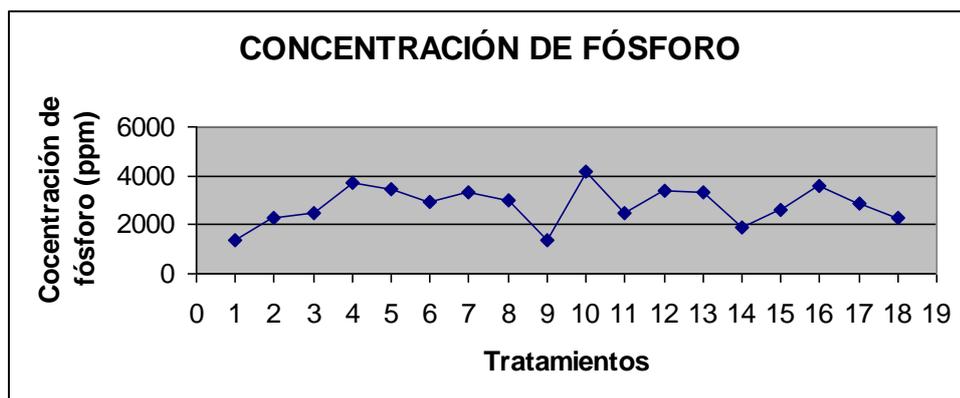


Figura 3.17 Concentración de fósforo en frondas de Helecho medidas por espectrofotometría UV.

La interacción de los factores estudiados se indica en la figura 3.18. En el gráfico **a.** se presenta la relación entre los niveles de arsénico y la absorción de fósforo en helecho en donde se presenta similitud al ensayo de avena, observándose que la absorción de fósforo en la planta es mayor cuando se ha aplicado la menor cantidad de arsénico.

El gráfico **b.** muestra que la mayor concentración de fósforo se obtiene con la aplicación de la especie *Pacispora sp.* que con *G. mosseae* igual a lo observado en el ensayo de avena. El gráfico **c.** presenta la relación de la absorción de arsénico mediada por los niveles de fósforo, donde se tiene una relación directa y que concuerda con la concentración en frondas de los helechos estudiados.

En el gráfico **d.**, se puede observar la relación del arsénico y micorriza con respecto a la absorción de fósforo encontrándose mayor presencia de fósforo con *Pacispora sp.* y niveles altos del elemento.

El gráfico **e.** muestra la relación entre arsénico y fósforo donde se indica que a mayores niveles de arsénico menores concentraciones de fósforo. Finalmente en el gráfico **f.** se muestra la relación entre micorriza y el fósforo determinando un pico alto en tratamientos con *Pacispora sp.* y niveles altos de fósforo.

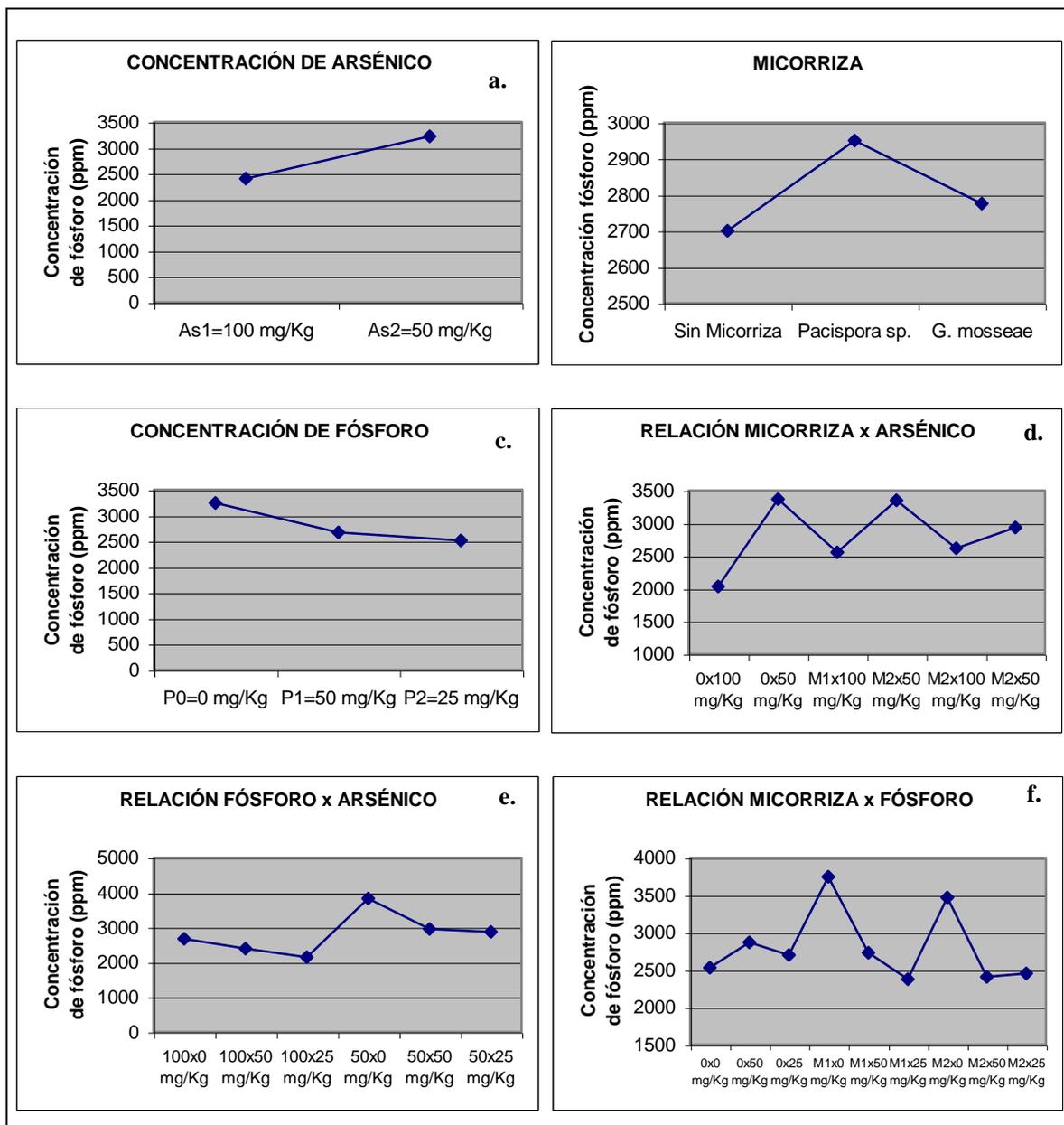


Figura 3.18 Gráficos del efecto de Micorriza, Arsénico, Fósforo y sus interacciones en la concentración de fósforo en Helecho.

3.5 GLOMALINA

Se identificó la cantidad de glomalina contenida en suelo de las macetas que presentaban inoculación con las dos especies de micorriza estudiadas, los datos fueron tabulados y la cantidad de arsénico fue calculada.

En la figura 3.19 se muestra la cantidad de glomalina encontrada en las macetas con inoculación. Se observa que existe el nivel más alto de un tratamiento con *Pacispora sp.* sin embargo existe mayor número de tratamientos de la especie *G. mosseae* con mayor cantidad de glomalina.

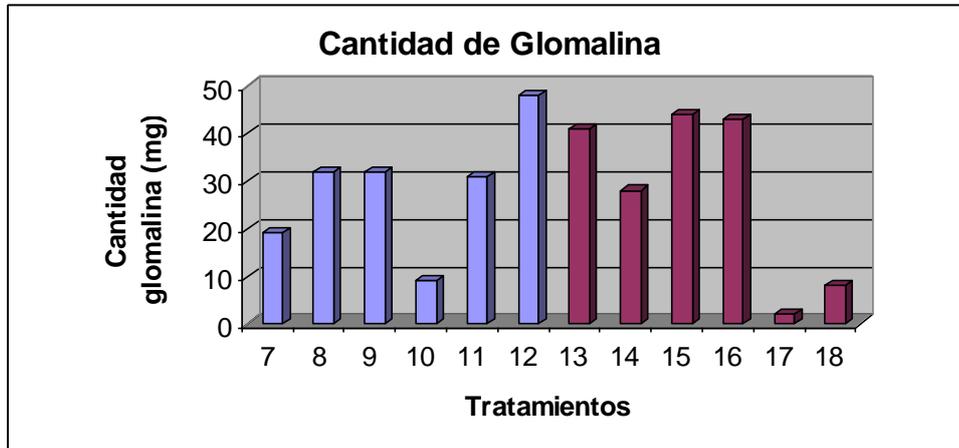


Figura 3.19 Cantidad de Glomalina en tratamientos inoculados con *Pacispora sp.* y *Glomus mosseae*.

La cantidad de arsénico contenida en la glomalina extraída se muestra en la figura 3.20 en donde se observa que en tratamientos que no presentan un peso alto de glomalina existe una concentración alta de arsénico a diferencia de aquellos que presentan mayor peso de glomalina total pero poseen menor concentración de arsénico.

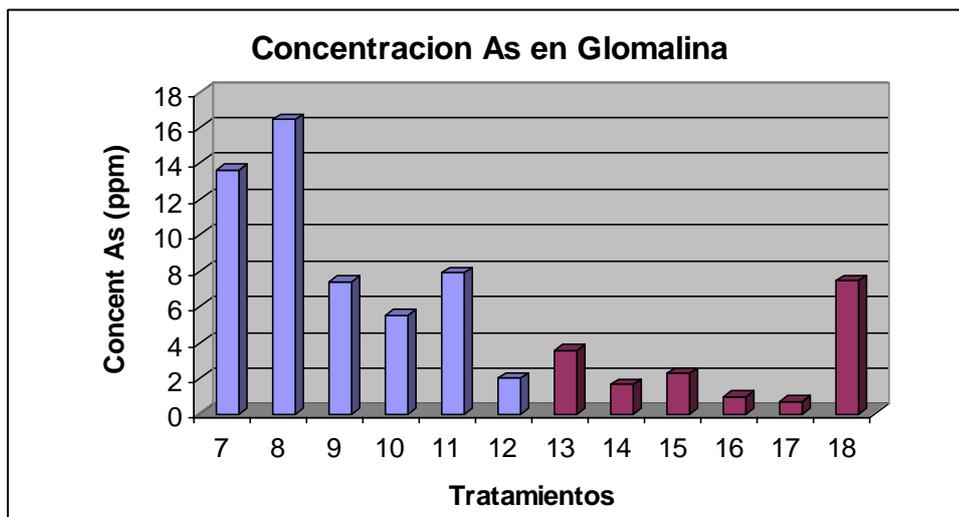


Figura 3.20 Concentración de arsénico presente en glomalina extraída medida por espectrofotometría de absorción atómica.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1 COLONIZACIÓN MICORRÍZICA

El porcentaje de colonización micorrízica en raíces de avena (*Avena sativa*) y helecho (*Nephrolepis sp.*) por las especies de hongos micorrízicos arbusculares estudiadas *Pacispora sp.* y *Glomus mosseae* fue desde 10 hasta 42% como se puede observar en las figuras 3.1 y 3.4, y los tratamientos que no tenían inoculación no presentaron evidencia de colonización. La colonización micorrízica es una variable importante para identificar la infección del hongo en la planta hospedera y el establecimiento de la simbiosis, lo que es clave para el comportamiento funcional de los HMA.

Referente a las especies estudiadas y su porcentaje de colonización se ha establecido que tanto en el ensayo de avena como en el de helecho, la micorriza 1 correspondiente a *Pacispora sp.* presenta mayor infección con respecto al porcentaje de micorrización de la micorriza 2 *G. mosseae*. La asociación micorrízica presenta vital importancia para establecer su funcionalidad, la que va relacionada con el rol que juega en el establecimiento de la planta a condiciones de estrés, en este caso a contaminantes (González-Chávez et al., 2002). Como se ha visto existe diferencia entre los porcentajes de colonización de acuerdo a los tratamientos establecidos, este comportamiento puede deberse a los factores ambientales a los que están expuestas las esporas de los tipos de micorrizas inoculadas, los cuales pueden afectar a su ciclo de vida y la capacidad de germinación, colonización y desarrollo del micelio externo (Read, 1999).

La relación simbiótica de la micorriza arbuscular y la planta viene dada por la afinidad que exista entre los dos sistemas, en el estudio se determinó que la avena fue la especie que presentó mayor colonización con respecto a helecho, algunos trabajos han demostrado que puede existir cierta especificidad al hospedero por la fisiología de la planta, la diferente constitución radical y señales químicas que puedan producirse entre el hongo y la planta (Manske y Vlek, 1994).

Es importante tomar en cuenta que el helecho pertenece al grupo de Pteridofitos que presentan vegetales criptogámicos vasculares, considerados plantas incompletas que presentan rizomas subterráneos que forman las frondas, por lo cual se tiene un sistema radical diferente a las plantas superiores, lo que podría explicar la menor incidencia de infección de hongos micorrízicos arbusculares en *Nephrolepis sp.* (Iqbal, 1980)

Otro de los factores principales que interfieren en la colonización de acuerdo a lo reportado por Portilla et al. (1998), es la concentración de fósforo. Se ha establecido que al aumentar la aplicación de fósforo en el suelo disminuye la colonización, la toma de este elemento puede estar en función de la capacidad fijadora por el suelo, y en relación con las diferentes especies de ensayos. Esto sustenta los resultados en el ensayo de avena según la figura 3.2 en donde se muestra mayor infección del hongo cuando existe la menor concentración de fósforo aplicada.

Según Mosse (1973), el aumento de las concentraciones de fósforo en la planta, tiene un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento de los hongos micorrízicos, sin embargo se sigue discutiendo sobre el mecanismo gracias al cual se producen resultados como éste, se ha explicado que cuando el suministro de fósforo es severamente deficiente para el crecimiento de la planta, la proporción de raíces infectadas por los HMA aumenta inicialmente (Bolan et al., 1984). Otra hipótesis que explica este comportamiento es la que sostiene que, el porcentaje de micorrización usualmente disminuye con la aplicación de fertilizantes, se establece que el aumento en el suministro de fósforo a la planta disminuye la permeabilidad de las membranas de las células radicales, lo cual a su vez reduce la concentración de carbohidratos solubles y compuestos nitrogenados en los exudados radicales los cuales serían inductores de la formación de micorriza arbuscular (Menge et al., 1978 y Thomson et al., 1991).

Es importante señalar que en el ensayo de helecho, se identifica un comportamiento contrario al de la avena como se muestra en la figura 3.5, donde se observa mayor colonización con la aplicación del mayor nivel de fósforo, según Manske y Vlek (1994) puede deberse a la fisiología del hospedero y no al efecto en el hongo y a la disposición del fósforo en el suelo, como ya se había mencionado las características del helecho.

Los niveles de arsénico también son factores que influyen en la colonización, al actuar en altas concentraciones como elemento tóxico. En la figura 3.2 y 3.5 se observó en los dos ensayos tanto de avena como de helecho, que la concentración más alta de arsénico 100 mg/Kg, presenta el mayor porcentaje de colonización, lo cual es congruente por la resistencia adaptativa de las especies de hongos utilizadas, ya que provienen de ambientes contaminados por arsénico, por lo que no se inhibe su germinación e infección (Navas, 2006). Este criterio se apoya también en estudios realizados por varios autores como Pawlowska y Chavart, 2004 en donde se demuestra que esporas del género *Glomus* presentan resistencia a compuestos tóxicos sin alterar su capacidad de germinación y funcionalidad.

Adicionalmente los resultados se sustentan con estudios de Agely et al. (2005), en donde se analizó la tolerancia a arsénico en una especie de helecho con micorrización; se obtuvo aumento de colonización con la concentración más alta de arsénico aplicada, semejante a lo obtenido en el presente estudio. Este comportamiento podría deberse a la interacción de las señales que emite la planta hospedera hacia el hongo micorrízico, ya que al encontrarse en condiciones de estrés por el contaminante, la planta necesita entrar en simbiosis para poder desarrollarse correctamente en el sustrato con arsénico.

4.2 BIOMASA

La evaluación del peso seco de una planta es un parámetro importante de comparación de crecimiento, principalmente cuando se trata de evaluar la productividad (Hernández et al., 1997). Se señala que el análisis de crecimiento representa el primer paso en el estudio de la biomasa y se considera el punto de unión entre la capacidad de producción de plantas y su comportamiento fisiológico.

Con base en lo anterior la evaluación del peso seco de la parte aérea del ensayo de avena y helecho, constituye un criterio importante para identificar la influencia de la micorriza arbuscular en la contribución del desarrollo de la planta frente a contaminación por arsénico. Como se puede ver en la figura 3.7 se identifica el efecto positivo, refiriéndose al mejor rendimiento de biomasa en plantas de avena que se presenta en macetas inoculadas con *Pacispora sp.* En el caso del ensayo de helecho en

la figura 3.9 se identifica la contribución de biomasa en macetas inoculadas con *G. mosseae*. Estos resultados determinan la influencia de los hongos estudiados en las plantas hospederas y se sustentan con amplios estudios realizados como los nombrados por Baker y Walker (1997) así como Leyval et al. (2001) y Ernst (2000), quienes sostienen que la asociación de las plantas con hongos micorrízicos representa una serie de importantes ventajas entre las que destacan protección contra ataque de parásitos y enfermedades, mayor área de extensión de las raíces facilitando la absorción de nutrimentos así como también contaminantes inorgánicos y orgánicos y como un efecto visual aumenta la biomasa aérea.

Adicionalmente, existen factores determinantes para la producción de biomasa en plantas como se muestra en la figura 3.8 y 3.10 donde se determina que existe menor cantidad de biomasa en macetas que presentan mayor nivel de arsénico, la cantidad de este elemento puede actuar como un factor inhibitorio del desarrollo de los dos ensayos al presentarse en alta concentración ya que puede actuar con cierto nivel de toxicidad para el vegetal.

Por el contrario con los niveles de fósforo, se tiene que a mayor concentración de este elemento, se produce mayor biomasa, esto debido a las características que presenta el fósforo como un elemento nutritivo importante para la planta consecuentemente se tiene mejor respuesta frente a altos niveles de este elemento. Según Marschner (1995) estableció en su estudio que la mayoría de plantas que se desarrollaban en concentraciones altas de fósforo presentan alto porcentaje de biomasa al utilizar este elemento para su nutrición.

4.3 CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO

La concentración de arsénico juega un papel principal en la investigación para identificar el comportamiento funcional de la micorriza arbuscular y la fitoabsorción que puede darse por parte de la planta. El arsénico puede actuar como un elemento tóxico en gran rango de organismos incluyendo plantas en donde se muestra un efecto de estrés frente a la exposición, con síntomas como inhibición radical, de crecimiento aéreo, hasta la muerte (Macnair y Cumbes, 1987); sin embargo se han estudiado sistemas de tolerancia a este compuesto mediados por procesos de reducción de arsenato

a arsenito en plantas, metabolizándose el arsénico a especies metiladas reduciendo el tipo de estrés provocado (Zaman y Pardini, 1996).

Basándose en estos procesos se han establecido otros estudios en los que se comprueba la capacidad reductora de algunas especies de hongos entre esos los micorrízicos, que pueden generar compuestos de arsénico metilados mediante mecanismos redox formándose especies arsenicales orgánicas que disminuyen la toxicidad de este elemento (Tamaki y Frankenberg, 1992). Los estudios nombrados sustentan la influencia de la micorriza frente a altas concentraciones de arsénico como las aplicadas en la presente investigación, en donde se muestra mayor cantidad de arsénico en hojas de avena y helecho en macetas que contienen la especie de micorriza 1 *Pacispora sp.* seguido por la especie 2 *G. mosseae* y un valor menor en macetas sin inoculación como se muestra en la figura 3.12 y 3.14. Además la capacidad de absorción fue mayor en la especie de avena, demostrándose que mediante la asociación hongo-planta se pudo dar mecanismos que permitan tolerar el contaminante y absorberlo. Esta contribución de especies de hongos micorrízicos arbusculares en el desarrollo de plantas en ecosistemas contaminados lo ha sostenido autores como Khan et al. (2000) y Abid et al. (2005).

Al hablar de arsénico en plantas es importante mencionar el papel que cumple el fósforo en la toma del metaloide. Muchos autores explican la dinámica del arsénico en plantas mediante el sistema de toma fosfato-arsenato, donde se ha demostrado que el arsenato y el fosfato son capturados por el mismo sistema de transporte en plantas (Ullrich-Eberius et al., 1989). El arsenato en mayores cantidades, al ser un análogo del fosfato inhibe la toma de fósforo por la planta y consecuentemente la producción de ATP lo que provoca un gran daño en el tejido vegetal. En mecanismos de tolerancia se dice que existe una supresión en la afinidad en la toma de fosfato- arsenato en donde pueden actuar también la micorriza al influenciar fuertemente en la adquisición de fósforo para la planta hospedera (Smith y Read, 1997).

En base a estos estudios se sustenta lo observado en la figura 3.12 donde se determina que a mayor concentración de fósforo presente en el suelo menor es la absorción de arsénico por parte de la planta. Así también se identifica la influencia de la micorriza en la toma de arsénico mediada por fósforo como estudios de Agely (2005),

donde establece que la simbiosis puede influenciar en el flujo de los dos elementos al favorecer la toma de fósforo, puede identificarse en las figuras 3.12 y 3.14 que en las interacciones de fósforo por las especies de micorriza utilizadas en la absorción de arsénico en hojas se tiene un comportamiento diferente en todos los tratamientos establecidos.

4.4 CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO

El fósforo es un elemento determinante en el análisis de la influencia de la micorriza en tolerancia a plantas a arsénico, como se ha detallado en el punto 4.3 existe una relación directa entre fosfato y arsenato. Así mismo se sabe que los hongos micorrízico arbusculares frecuentemente aumentan la adquisición de fósforo en las plantas (Smith y Read, 1997).

La concentración de fósforo en la parte aérea de las plantas tiene relación con el arsénico, a mayor nivel de este elemento menor cantidad de fósforo, respondiendo a criterios ya analizados. Como se observa en las figuras 3.16 y 3.18. es importante mencionar también que según Rivera et al. (2002) las plantas inoculadas con micorriza y cultivadas bajo estrés de compuestos tóxicos, pueden tener una mejora sobre la adquisición de fósforo como lo observado en ciertos tratamientos como se muestra en la figura 3.18e.

Referente a la especie que mejor rendimiento presentan en cuanto al contenido de fósforo en hojas de los dos ensayos se tiene a *Pacispora sp.* seguido por la especie *G. mosseae* que es consistente con estudios que han determinado la contribución de hongos micorrízicos del Género *Glomus* en la captura de fósforo en la planta hospedera en donde se ha determinado que el incremento de fósforo se debe en gran medida a las hifas del hongo (Kothari et al., 1991)

4.5 GLOMALINA

La glomalina es una molécula con alto interés en el estudio de la formación de agregados del suelo y en la captura de compuestos tóxicos por ser una proteína insoluble en su estado natural y con posible carácter hidrófobo (Wright y Upahyaya, 1998). Se ha

registrado que los exudados que presentan la mayoría de hongos micorrízicos del orden Glomales constituyen la glomalina que se encuentra en hifas y dispersas en el suelo (González-Chávez et al., 2004). En referencia a estos estudios se muestra en la figura 3.19, la cantidad de glomalina obtenida en los tratamientos inoculados con las micorrizas estudiadas, se encuentra en mayor porcentaje en las macetas con la Micorriza 2 *G. mosseae* con respecto a la Micorriza 1 *Pacispora sp.* esto puede explicarse por la diferencia de la formación de estructuras fúngicas que pueden formar las dos especies.

González-Chávez et al., 2004, ha demostrado la capacidad de la glomalina en la captura de compuestos tóxicos, por las propiedades de esta proteína en actuar como adherente en la formación de agregados del suelo. En la investigación se determinó como se muestra en la figura 3.20, que los tratamientos cuyos inóculos presentaron producción de glomalina, tienen presencia de arsénico en su contenido, se ha presentado concentraciones que van desde 0.7 a 16 mg/L de este elemento, concentraciones considerables respecto a la poca cantidad de la proteína obtenida. Se muestra que la concentración de arsénico no está relacionada con la cantidad de glomalina, ya que en tratamientos con mayor peso de glomalina presenta menor concentración de arsénico, debido posiblemente a la funcionalidad que presentan los tipos de micorrizas, mostrándose mayor actividad en *Pacispora sp.* referente a *G. mosseae*.

CAPITULO V: CONCLUSIONES

1. Los hongos micorrízicos arbusculares estudiados, *Pacispora sp.* y *Glomus mosseae* contribuyen positivamente al desarrollo de plantas bajo condiciones de contaminación por arsénico.
2. Los dos tipos de hongos arbusculares *Pacispora sp.* y *Glomus mosseae* presentan infección en las dos especies de plantas hospederas avena (*Avena sativa*) y helecho crespo (*Nephrolepis sp.*).
3. Las especies de micorriza arbuscular analizadas *Pacispora sp.* y *Glomus mosseae*, contribuyen al aumento de la biomasa aérea de las mismas, en presencia de las concentraciones de arsénico aplicadas.
4. *Pacispora sp.* es la especie más adaptada a los niveles administrados de arsénico y presenta mayor contribución al desarrollo de avena (*Avena sativa*) y helecho crespo (*Nephrolepis sp.*).
5. La micorriza funciona como un mecanismo mediador en la protección y adaptación de la planta a ambientes contaminados permitiendo mayor paso del contaminante a sus hojas.
6. Entre los factores que afectan la funcionalidad de la micorriza arbuscular está el hospedero, el cual puede tener un efecto selectivo en el comportamiento del hongo.
7. La avena (*Avena sativa*), es la planta hospedera que se desarrolla mejor en macetas con el mayor nivel aplicado de arsénico y la que presenta mayor absorción de este elemento en hojas.
8. Se comprobó que la captura de arsénico esta influenciada por los niveles de fósforo. A menor cantidad de fósforo contenido en el suelo mayor es la concentración de arsénico absorbida por la planta y viceversa.

9. Las especies de hongos micorrízicos estudiados presentan producción de glomalina. Se comprobó que esta proteína tiene la capacidad de capturar al elemento tóxico.

10. Los resultados del estudio muestran que la hipótesis planteada debe ser aceptada; ya que se determinó que la inoculación de las dos especies de hongos micorrízicos arbusculares contribuye a la absorción y tolerancia de arsénico en las plantas de avena y helecho, siendo el fósforo un elemento limitante en la dinámica del arsénico en la planta.

CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

- La aplicación del inóculo en las plantas hospederas en este trabajo, fue efectuada por esporas extraídas de los cultivos trampas en mantenimiento, es recomendable tomar la menor cantidad de agua posible al colocar las esporas cerca de la raíz, lo que evita que se desplacen y pueda existir una mejor colonización.
- Es importante tener en cuenta que para el análisis de arsénico en plantas es necesario secar la muestra a menos de 35 °C para evitar la volatilización del arsénico, sin embargo un proceso óptimo sería liofilizar la muestra vegetal.

CAPITULO VII: BIBLIOGRAFIA

Abid A., David M.S. y Lena Q.M. (2005). Mycorrhizae increase Arsenic uptake by the hyperaccumulator Chinese brake Fern (*Pteris vittata*). *Journal of environmental quality*. 34:2181-2186.

Alloway B.J. (1990). Soil processes and the behaviour of metals. *Heavy Metals in Soils*. 7-28.

Ávila C., Cedillo E. y Cervantes V. (2000). Base de información sobre especies con potencial de abonos verdes y cultivos de cobertera. Universidad de Chapingo. Extraído el 30 de abril, 2007 de <http://www.rockfound.org.mx/basinfespecies.html>

Bago B., Azcón-Aguilar C., Goulet A. y Piché. (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 139: 375-388.

Baker A.J. y Walker P.L. (1997). Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant Plants. In Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. *Exophysiology* 155-177.

Berg M., Tran H.C., Nguyen T.C., Pham H.V., Schertenleib R. y Giger W. (2001). Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: a human health threat. *Environmental Science and Technology* 35: 2621-2626.

Bolan N.S., Robson A.D. y Barrow N.J. (1984). Increasing phosphorus supply can increase the infection of plant roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 16:419-420.

Borrego-Hernandez A. (1999). Micorrizas. Extraído el 14 enero, 2006 de <http://www.cdeea.com/micorrizas.htm>

Brundrett M.C. (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. In: Macfayden A, Begon M y Fitter AH *Advances in Ecological Research*. 21:171-313.

Brundrett M.C. (1999). Micorrizas arbusculares. CSIRO Forestry and Forest products. Extraído el 7 diciembre, 2006. de <http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza.html>

Calvo C., Alvarez-Benedí J., Andrade M., Marinero P. y Bolado S. (2003). Contaminación por Arsénico en Aguas Subterráneas en la Provincia de Valladolid: Variaciones Estacionales. Pp:91-98, en : J. Álvarez- Benedí y P. Marinero. Estudios en la Zona no Saturada del Suelo Vol VI, Valladolid 2003.

Carbonell Barrachina A. (1995). Arsénico en el sistema suelo-planta, significado ambiental. España. Universidad de Alicante. Extraído el 13 de diciembre, 2005. de: <http://publicaciones.ua.es/Castellano/VerLibro.asp?ISBN=84-7908-192-9>

Chaney R.L., Mallik M., Li Y.M., Brown S.L., y Brewer E.P. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Currence Opinion of Biotechnology* 8: 279-84.

Chen T.B., Wei C.Y., Huang Z.C., Huang Q.F., Lu Q.G. y Fan Z.L. (2002). Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chin. Science Bull.* 47: 902-905.

Chun-Nu G., Yong-Guan Z., Yi-Ping T., Smith S. y Smith F. (2006). Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 62: 608-615.

Clements H.F. y Munson J. (1947). Arsenic toxicity studies in soil and culture solution. *Pac Science.* 1: 151-171.

De la Torre E., Guevara A., Muñoz G., Criollo E., (2004). Estudio de aguas superficiales y sedimentos de la cuenca de los ríos sucus, tambo y papallacta. Departamento de Metalurgia Extractiva EPN. Ecuador.

Deuel L.E., y Swoboda A.R. (1972). Arsenic solubility in a reduced environment. *Soil Science Society Ambiental Proceses* 36:276-278.

Duchicela J. y González-Chávez M.C. (2003). La micorriza arbuscular en el contexto de la agricultura sustentable, Monografía, CEINCI, Sangolquí. Editorial.

Ernst W.H. (2000). Evolution of metal hyperaccumulation and phytoremediation. *New Phytologist* 146, 357-357.

Ferguson J.F. y Gavis J. (1972). A review of the arsenic cycle in natural waters. *Water Resource* 6: 1259-1274.

Gerdemann J.W y Nicholson (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transnational British Mycological Society* 46: 235-244.

Giovannetti B.Y. y Mosse B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500

Gomez-Camirero P., Howe M., Hughes E., Kenyon D.R., Lewis M., Moore J.N, Aitio A. y Becking G. (2001). Micorriza arbuscular. Extraído el 2 de marzo, 2006. de: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>.

González-Chávez M.C. (2000). Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. In: la edafología y sus perspectivas al siglo XXI. Tomo II. México. Colegio de Postgraduados, Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma Chapingo.

González-Chávez M.C. (2002). Hongos micorrízicos arbusculares y los mecanismos de defensa de las plantas a patógenos del suelo. México. Colegio de Postgraduados.

González-Chávez M.C., Pérez-Moreno J. y Carrillo-González R. (2005). El sistema Planta-Microorganismo-Suelo en áreas contaminadas con residuos de minas Montecillo estado de, México. Colegio de Postgraduados.

González-Chávez M.C., Gutiérrez-Castorena y Wright S. (2004). Hongos micorrízicos arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad. *Terra Latinoamericana* 22: 507-514

González-Chávez M.C., Dodd J.C., Harris P. y Meharg A. (2002). Arsenate resistance in arbuscular mycorrhizal associations: implications for phosphorus nutrition plants. *New Phytologist* 155: 167-171

González-Chávez M.C., Carrillo-González R., Wright S. y Nicholson K. (2004). The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 130: 317-323.

Griffioen W.A. y Ernst E.H. (1994). The role of VA mycorrhizae in the heavy metals tolerance of *Agrosti capillaris* L. *Agriculture Ecosystem Environmental* 29, 173-177.

Harley J.L. y Smith S.E. (1983). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.

Hernández I., Peralta G., Pérez-Lloréns J., Vergara J. y Niell X. (1997). Biomass and dynamics of growth of *Ulva* species in Palmones River Estuary. *Journal of Phycology* 33: 764-772.

INVAM. 1999. Extraído el 6 de marzo, 2006. de: <http://invam.caf.wvu.edu/methods/spores/extraction.htm>

Iqbal B.S., Yousaf M. y Younus M. (1980). A field survey of mycorrhizal associations in ferns of Pakistan. *New Phytologist*. 87: 69-79.

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

Klironomos J. (2000). Host specificity and functional diversity among arbuscular mycorrhizal fungi. In: Microbial Byosistems: New Frontiers. Proceedings of the 8th international symposium on Microbial Ecology. Bell, CR, M Brylisnky, P Johnson-Gree. Atlantic. *Canada Society for microbial ecology*.

Kothari S.K., Marschner H. y Rymheld V. (1991). Contribution of the mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in calcareous soil. *Plant and Soil* 131:177-185.

Lancaster R.J., Coup M.R. y Huges J.W. (1971). "Toxicity of arsenic present in Lakeweed". N. Z. *Vet. J.* 19: 14-5.

Leyval C. y Binet P. (1998). Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil arbuscular mycorrhizal plants. *Journal Environmental Quality* 27:402-407.

Leyval C., Joner E.J., Del Val C. y Haselwandter K. (2000). Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. Mycorrhizal Technology in Agricultura. *Mycorrhiza* 278-310

Leyval C., Joner E., Del Val C. y Haselwandter K. (2001). Potencial of arbuscular mycorrhiza for bioremediation. *Mycorrhiza*. 7 (2): 308-317.

Lovley D.R. y Coates J. D. (1997). Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnology* 8, 285-289.

Macnair M.R. y Cumbes Q. (1987). Evidence that arsenic tolerance in *Holcus lanatus* is caused by an altered phosphate uptake system. *New Phytologist* 107: 387-394

Manske, G. y G. Vlek. (1994). The prospects of developing nutrient efficient varieties (nev) for wheat based on symbiosis with va mycorrhizal fungi. In: Crop tolerance to abiotic stresses. BEHL, R.K. (ed.). CCS Haryana Agricultural University. India.

Marschner H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.

Meharg A.A. y Hartley-Whitaker J. (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist* 154: 29-43

Meharg A.A. y Macnair M.R. (1990). An altered phosphate uptake system in arsenate tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytologist* 116: 29-35.

Meharg A.A. y Macnair M.R. (1992). Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system- a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Journal of xperimental Botany* 43: 519-524.

Menge J.A., Steirle D.J., Bagyaraj E.L., Johnson y Leonard R.T. (1978). Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytologist* 80: 575-578.

Morton J.B. y Benny G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales; tow new suborder, Glomineae and 129 Gigasporinae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with and remendation of Glomaceae: *Mycotaxon* 37, 471-491.

Navas, SE. (2006). Evaluación de la tolerancia a arsénico de las esporas de cuatro especies de hongos arbusculares. Tesis. Escuela Politécnica del Ejército.

Navarrete H., León B., Gonzales J., Avilés D., Recaro J., Mellado F. y Ollgaard B.(2006). Helechos. *Botánica Económica de los Andes Centrales* 2006: 385-411.

N.A.S. (1977). Medical and biologic effects of environmental pollutants: Arsenic. Washington, D.C., *National Academy of Sciences*.

Nichols K. (2003). Characterization of glomalins, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. PhD dissertation. University of Maryland. College Park, MD.

Nickson R., McArthur J., Burgess W., Ahmed K.M., Ravenscroft P. y Rahmann M. (1998). Arsenic poisoning of Bangladesh groundwater. *Nature* 395:338

Ohel F. y Sieverding E. (2004). *Pacispora* a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany*. 78:72-82.

O.M.S. Organización Mundial de la Salud (2006). Mitigación de los efectos del arsénico presente en las aguas subterráneas. Informe de la Secretaría. Consejo Ejecutivo EB118/14. 118ª reunión.

Olson O.E., Sisson L. y Moxon A.L. (1940). Absorption of selenium and arsenic by plants from soils under natural conditions. *Soil Science* 50: 115-18.

O'Neill G. (1991). Hierarchy the oryasa guide to mycorrhizal research on large scale problems. *Environmental Pollution* 73 : 271-284 .

Pawlowska T. y Chavart I. (2004). Heavy-Metal stress and developmental patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Environmental Microbiology*. 70: 6643-6649.

Phillips J.M. y Hayman D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-160.

Phillips D.J. (1990). Arsenic in aquatic organism: a review emphasizing chemical speciation. *Aquatic Toxicology*. 16: 151-186.

Portilla Cruz I., Molina Gayosso E., Cruz-Flores G., Ortiz Monasterio I. y Manske G.G.B. (1998). Colonización micorrízica arbuscular, actividad fosfatásica y longitud radical. *Revista Terra* 16:1: 51-61.

Prasad M.N. (1999). Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems, pp.51-72. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Read D.J. (1999). The ecophysiology of mycorrhizal symbioses with special referent to impacts upon plant fitness. In: Press MB, JD Scholes, MG Barker. *Physiological plant ecology*. Blacwell Science, Oxford. Reino Unido.

Rillig M.C. y Steinberg P.D. (2002). Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: A mechanism of habitata modification. *Soil Biological Biochemistry* 34:1371-1374.

Rivera B.F., Calantzis C., Turnau T., Pierre C.J., Belimov A.A., Gianinazzi S., Strasser R.J., Gianinazzi P.V. (2002). Cadmium accumulation and buttering of cadmium-inocued strees by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Experimental Botany* 53: 1177-1185.

SAS Institute. (1990). The SAS system for Windows. Version 8.2. SAS Inst., Cary, NC.

Smith S.E. y Read D.J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. 2o. Edition. Academic Press. London

Schubler A., Schwarzott D. y Walker C. (2001). A new fungal phylu, the Glomeromycota phylogeny and evolution. *Mycological Reasearch* 105:1413-1421

Schutzendubel A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy-metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. J. *Experimental Botanical* 53:1351-1365.

Shetty K.G., Hetrick B.A. y Schwab A.P. (1995). Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerance of plants. *Environment Pollution* 88:307-314, 1995.

Sharples J.M., Meharg A.A., Chambers S.M. y Cairney J.W. (1999). Mechanism of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal. *New Phytologist* 87:69–79. 2000a.

Thomson B.D., Robson A.D. y Abbott L. K. (1991). Soil mediated effects of phosphorus supply on the formation of mycorrhizas by *Scutellispora calospora*

(Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders on subterranean clover. *New Phytologist* 118: 463-469.

TULAS. Texto Unificado de Legislación ambiental Secundaria. (2000). Extraído el 2 de marzo, 2007. de: [http:// www.cae.org.ec/ordenanzas/Q14.pdf](http://www.cae.org.ec/ordenanzas/Q14.pdf)

Tamaki S. y Frankenberg WT. (1992). Environmental biochemistry of arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 124:79-110.

Ullrich-Eberius C.I., Sanz, A. y Novacky J. (1989). Evaluation of arsenic and vandate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *Journal of Experimental Botany* 40, 119e128

Walker C. (1986). Taxonomic concepts in the Endogonaceae. II A fifth morphological wall type in endogonaceous spores. *Mycotaxon* 18: 443-455.

Walsh L.M. y Keeney D.R. (1975). Behaviour and phytotoxicity of inorganics arsenicals in soil. pp 35-52. In: Arsenical Pesticides. American Chemical Society Symposium Vol 7. *American Chemical Society*. Washington.

Wauchope R.D. (1983). Uptake, translocation and phytotoxicity of arsenic in plants. pp 348-374. In: Arsenic: Industrial, Biomedical, Environmental Perspectives Arsenic Symposium, Gaithersburg, Maryland. Van Nostrand Reinhold Company. New York, N.Y.

Weissenhorn I. y Leyval C. (1996). Spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi in soils differing in heavy metals content and other parameters. *Europe Journal Soil Biology* 32, 165-172.

Woolson E.A. (1973). Arsenic phytotoxicity and uptake in six vegetable crops. *Weeds Science* 21: 524-7.

Wright S. y Upahyaya. (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198:97-107.

Wright S. y Upahyaya. (1998). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*

161:575-586.

Wright y Nichols K.A., (2002). Extraído el 14 de diciembre, 2005 de:
<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/sep02/soil0902.htm>.

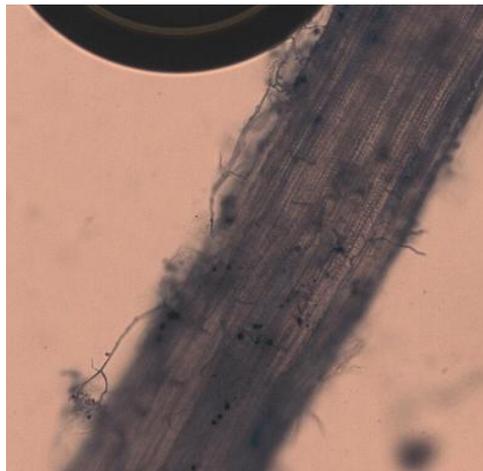
Zaman K. y Pardini R.S. (1996). AN overview of relationship between oxidative stress and mercury and arsenic. *Toxic substance Mechanisms* 15: 151-181.

ANEXOS

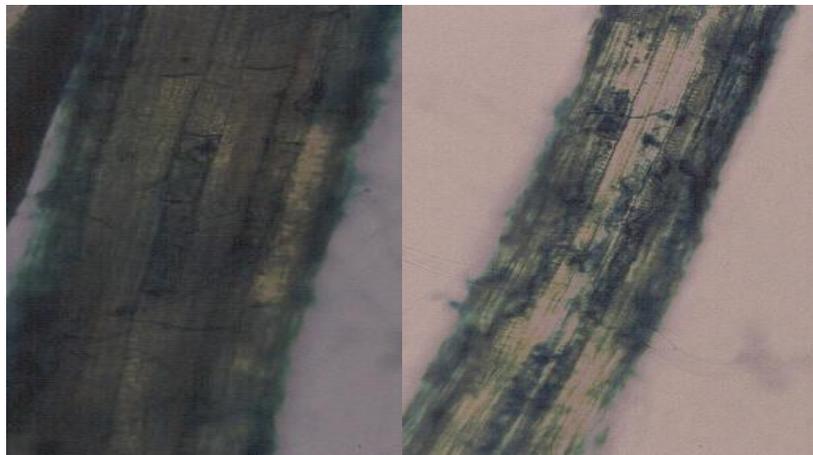
Anexo 1: Colonización micorrízica en Avena



Raíz de Avena micorrizada. 10X.



Raíz de Avena micorrizada. Micélio. 10X

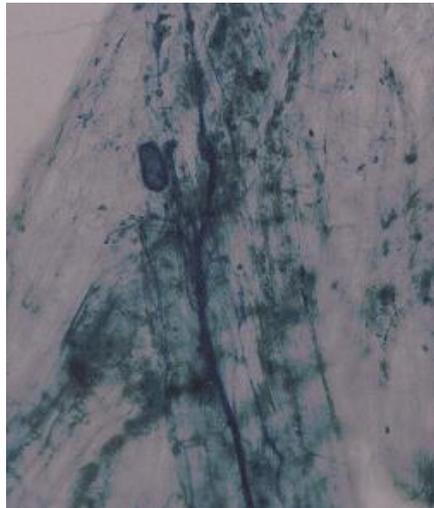


Raíz de Avena micorrizada. 10X

Anexo 2: Colonización micorrízica en Helecho



Raíz de Helecho micorrizada. Vesículas. 10X

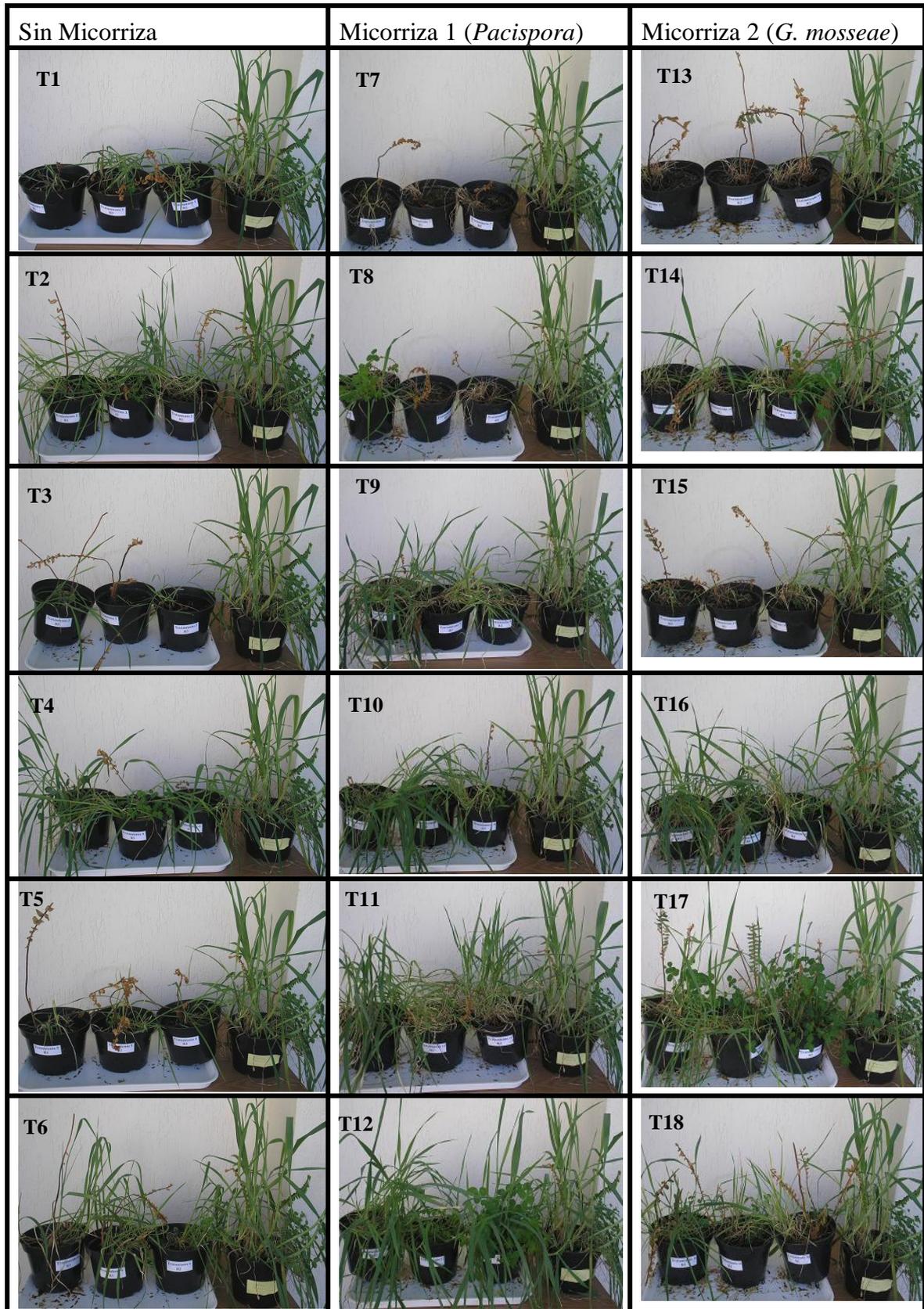


Raíz de Helecho micorrizada. 10X



Raíz de Helecho micorrizada. 10X

Anexo 3: Biomasa aérea



Anexo 4: Extracción de Glomalina

