



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO DE HONGOS MICORRÍCICOS  
ARBUSCULARES (HMA) EN LA ABSORCIÓN DE SODIO Y PLOMO EN  
CUCURBITÁCEAS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.**

**Trabajo de Titulación Previo a la Obtención del Título de Magister de  
Investigación en Biotecnología Agrícola**

Presentada por:

Jaime Alberto Naranjo Morán

Guayaquil – Ecuador

2018

## AGRADECIMIENTO

A mis padres por ser mi motivación constante, a mi director de tesis Ph. D. Milton Barcos Arias por su apoyo, orientación y paciencia brindada durante el desarrollo de este trabajo, también al Ms.C. José Flores, a la Ph. D. Paola Calle y al Ph. D. Efrén Santos por sus contribuciones al trabajo realizado.

De manera especial a mis compañeros del Área de Biorremediación Javier Oviedo, Andy Mora, Alex Albiño, Anita Segura, Emy Moína.

A Omar Alvarado por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Ph. D. Daynet Sosa directora del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por permitirme realizar este proyecto en el Área de Biorremediación.

## DEDICATORIA

A mis padres, la Sra. Leonor Morán  
y el Sr. José Naranjo por su apoyo  
y amor incondicional.

A mis hermanos, Mariuxi y José  
por el apoyo total en mi  
crecimiento profesional.

A mis abuelitos Rebeca y Segundo,  
a toda mi familia por su apoyo  
absoluto.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

Ramón Espinel Martínez, Ph. D.

**DECANO DE LA FCV  
O DELEGADO**

---

Milton Barcos Arias, Ph. D.

**DIRECTOR DE TESIS**

---

Ms. C. José Flores Cedeño

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

---

Efrén Santos Ordoñez, Ph. D.

**VOCAL**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”.

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

---

Jaime Alberto Naranjo Morán

## GLOSARIO

**Arbúsculos:** Son estructuras en forma de árbol producidas por endomicorrizas las mismas que pueden vivir por tan solo siete días dentro de la célula vegetal.

**Biorremediación:** Uso de organismos vivos para neutralizar o eliminar contaminantes de nichos contaminados.

**Fitoextracción:** También llamado “fitoacumulación”, definido como la absorción de metales nocivos en raíces acumulados en tallos y hojas.

**Metal pesado:** Elemento químico con propiedades metálicas con densidad cinco veces mayor a la del agua.

**Micorrizas:** Son hongos que actúan en simbiosis con las plantas en la zona radicular y se encuentran en la mayoría de las plantas vasculares.

**Tolerancia:** Capacidad positiva que tienen los cultivos para enfrentar niveles altos de agentes contaminantes.

**Toxicidad:** Cantidad específica de una sustancia que bajo ciertas condiciones causa efectos perjudiciales a los seres vivos.

**Vesícula:** Estructura que almacena nutrientes generadas por endomicorrizas arbusculares.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	2
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	2
1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN .....	3
1.2 OBJETIVO GENERAL .....	3
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.4 MARCO TEÓRICO .....	4
CAPÍTULO 2 .....	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
2.1 Obtención del material biológico.....	7
2.2 Diseño experimental.....	8
2.3 Condiciones del sistema .....	8
2.4 Ensayo de crecimiento de las cuatro especies de Cucurbitáceas en presencia de Na y Pb. ....	9
2.5 Crecimiento de <i>Cucurbita ecuadoriensis</i> y <i>Cucumis melo</i> en sustratos con Na y Pb e inoculadas con HMA.....	10
2.6 Análisis estadístico.....	13
CAPÍTULO 3 .....	14
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
3.1 Efecto de la imbibición de Cucurbitáceas silvestres y comerciales bajo concentraciones de Pb y Na. ....	14
3.2 Efecto del Pb y Na en el crecimiento de Cucurbitáceas.....	15
3.3 Efecto del Na y Pb en el crecimiento CEC y CME utilizando HMA. ....	20
CAPÍTULO 4 .....	28
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	28
4.1 CONCLUSIONES.....	28
4.2 RECOMENDACIONES .....	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXOS DE FIGURAS.....	37
ANEXOS DE TABLAS.....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Contenido de Pb en los fertilizantes .....	4
<b>Tabla 2.</b> Diseño bifactorial para las Cucurbitáceas evaluadas con Na y Pb.....	9
<b>Tabla 3.</b> Diseño bifactorial para las Cucurbitáceas evaluadas con Na y Pb inoculadas con HMA .	11
<b>Tabla 4.</b> Biomasa seca generada por los cuatros especímenes vegetales de Cucurbitáceas crecidas en sustratos con diferentes concentraciones de Na y Pb. ....	18
<b>Tabla 5.</b> Biomasa seca total obtenida en alamama (CEC) y melón (CME) crecidas en sustratos con diferentes concentraciones de Na y Pb e inoculadas con HMA.....	25
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de retención micorrícica en CEC y CME.....	27
<b>Tabla 7.</b> Solución hidropónica modificada de Steiner.....	40
<b>Tabla 8.</b> Germinación de Cucurbitáceas en la imbibición con Pb .....	40
<b>Tabla 9.</b> Germinación de Cucurbitáceas en la imbibición con Na.....	41
<b>Tabla 10.</b> Parámetros agronómicos evaluados a la séptima semana sobre Cucurbitáceas tratadas con cloruro de sodio .....	42
<b>Tabla 11.</b> Parámetros agronómicos evaluados a la séptima semana sobre Cucurbitáceas tratadas con nitrato de plomo sin inoculación de HMA .....	43
<b>Tabla 12.</b> Acumulación de Na en biomasa de Cucurbitáceas cultivadas y silvestres.....	44
<b>Tabla 13.</b> Acumulación de Pb en biomasa de Cucurbitáceas cultivadas y silvestres .....	45
<b>Tabla 14.</b> Variables agronómicas evaluadas con HMA a la séptima semana después de la inoculación en CEC y CME .....	46
<b>Tabla 15.</b> Clorofila evaluada con HMA a la séptima semana después de la inoculación. ....	47
<b>Tabla 16.</b> Acumulación de Na y Pb sobre melón (CME) y alamama (CEC) usando HMA determinados en biomasa aérea y radicular.....	48



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Biometría de Cucurbitáceas.....	11
<b>Figura 2.</b> Experimento de imbibición utilizando semillas de Cucurbitáceas en diferentes concentraciones de nitrato de plomo y cloruro de sodio .....	14
<b>Figura 3.</b> Parámetros evaluados con diferentes concentraciones de Na y Pb.....	16
<b>Figura 4.</b> Tratamientos evaluados con diferentes concentraciones de Na. ....	17
<b>Figura 5.</b> Tratamientos evaluados con diferentes concentraciones de Pb.....	17
<b>Figura 6.</b> Análisis de componentes principales usando cuatro variables para determinar la acumulación de Na en la biomasa (aérea y radicular) de Cucurbitáceas evaluadas durante siete semanas .....	19
<b>Figura 7.</b> Análisis de componentes principales usando cuatro variables para determinar la acumulación de Pb en la biomasa (aérea y radicular) de Cucurbitáceas evaluadas durante siete semanas .....	20
<b>Figura 8.</b> Parámetros evaluados con diferentes concentraciones inoculadas con HMA en alamama y melón.....	21
<b>Figura 9.</b> Desarrollo morfológico de las especies CEC y CME crecidas en sustratos contaminados por Na y Pb inoculadas con HMA a los 52 días de evaluación... ..	22
<b>Figura 10.</b> Contenido de clorofila en las especies CEC y CME crecidas en sustratos con diferentes concentraciones de Na y Pb evaluadas a los 52 días e inoculadas con HMA.....	23
<b>Figura 11.</b> Infección micorrícica inicial y final de las plantas de melón (CME) y alamama (CEC) crecidas en sustratos con diferentes concentraciones de Pb y Na.....	23
<b>Figura 12.</b> Estructuras infectivas de los HMA observadas a los 52 días de experimentación con lente 40x en plantas de melón (CME) y alamama (CEC).....	24
<b>Figura 13.</b> Análisis de componentes principales usando cuatro variables para determinar la acumulación de Na en la biomasa (aérea y radicular) de (CME) y alamama (CEC) inoculadas con HMA evaluadas durante siete semanas.....	26
<b>Figura 14.</b> Análisis de componentes principales usando cuatro variables para determinar la acumulación de Pb en la biomasa (aérea y radicular) de (CME) y alamama (CEC) inoculadas con HMA evaluadas durante siete semanas.....	26
<b>Figura 15.</b> Conductividad eléctrica y potencial de hidrógeno desarrollado en el sustrato utilizado en tamo y arena hasta la séptima semana de evaluación.....	37
<b>Figura 16.</b> Conductividad eléctrica y potencial de hidrógeno desarrollado en el sustrato utilizado en tamo y arena hasta la séptima semana de evaluación en tres muestreos utilizando HMA .....	37
<b>Figura 17.</b> Digestión y lectura de Pb por espectroscopia de absorción atómica; A) Pesado de muestras, B) Digestor de microondas, C) Filtrado de muestras digeridas, D) Control de calidad estandar, E) Lectura de muestras en espectro. ....	38
<b>Figura 18.</b> Curva de calibración del espectrofotómetro de absorción atómica para el análisis de Pb en biomasa de Cucurbitáceas.....	38
<b>Figura 19.</b> Experimento de imbibición de semillas en nitrato de plomo (A) cloruro de sodio (B) y sobre CEC, CLA, CME y CMO germinadas en Na y Pb (C y D). ....	39

## ABREVIATURAS

CE	Conductividad eléctrica.
pH	Potencial de hidrógeno.
ppm	Partes por millón.
dS m <sup>-1</sup>	Decisimens por metro.
m	Metros.
mg	Miligramos.
HMA	Hongos micorrícicos arbusculares.
cm	Centímetros.
CLA	Sandía ( <i>Citrullus lanatus</i> )
CME	Melón ( <i>Cucumis melo</i> )
CMO	Zapallo manabita ( <i>Cucurbita moschata</i> )
CEC	Alamama ( <i>Cucurbita ecuadoriensis</i> )

## SIMBOLOGÍA

h	Altura.
NaCl	Cloruro de sodio.
gl	Grados de libertad.
°C	Grados centígrados.
L	Litros
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Nitrato de plomo
%	Porcentaje.

## RESUMEN

La salinidad y los metales pesados son factores abióticos que afectan de forma directa a la fisiología de las plantas y por ende a su producción. Bajo este contexto, se evaluó el efecto de un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la fitoextracción de Na y Pb en Cucurbitáceas (*Cucumis melo*, *Citrullus lanatus*, *Cucurbita moschata* y *Cucurbita ecuadoriensis*) bajo condiciones controladas. Para el estudio se utilizó un sistema semi-hidropónico (tamo: arena) en concentración 1:1 con solución nutritiva modificada de Steiner, durante siete semanas después del trasplante. El Na fue evaluado en cinco concentraciones (2, 4, 8, 12 y 16 dS m<sup>-1</sup>) y Pb en concentraciones de 0, 125, 250, 500 y 1000 ppm. Además, se determinó si estos elementos afectan o benefician la simbiosis entre Cucurbitáceas y los HMA. Para el estudio se realizaron experimentos aleatorios y luego analizados en software Imagen J e Infostat para inferir las variables agronómicas. Los resultados manifestaron un efecto negativo sobre las concentraciones de Na y Pb en todos los ensayos, siendo sandía (*C. lanatus*) y melón (*C. melo*) las más afectadas, mientras alamama (*C. ecuadoriensis*) y zapallo (*C. moschata*) se mostraron más tolerantes; sin embargo, mayor tolerancia al Na y Pb se dio usando HMA en melón y alamama.

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La salinidad causa problemas en la producción agrícola y como consecuencia pérdidas para los productores locales, en Ecuador los suelos con problemas de salinidad se encuentran sobre todo en las provincias costeras. Lugares donde se producen una gama de cultivos comerciales viéndose estos afectados por el sodio (Na), elemento que ingresa fácilmente a la planta causando toxicidad, además los metales pesados también son una problemática en el sector agrícola, debido a que producen desequilibrios en la nutrición y bajos rendimientos en los cultivos, muchos de ellos provenientes de agroquímicos y fertilizantes.

Los suelos se hacen salinos debido al uso indiscriminado de fertilizantes y la explotación intensiva del suelo cultivado produciendo desagregación de las partículas por ejemplo en la zona de la península Santa Elena los problemas ocurren debido a la génesis del suelo y al alto contenido de sales presentes en el agua de riego (Proaño et al., 2011). Mientras que estas zonas productivas también se encuentran influenciadas por la contaminación generada por los insumos agrícolas y actividad antropogénica, un claro ejemplo es la preocupación por la elevada concentración de cadmio en la nuez de cacao.

Una de las alternativas de mitigación para las elevadas concentraciones de Na y Pb presente en el suelo es el uso de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), tal como se ha demostrado en plantas micorrizadas de *Cucurbita pepo* que han logrado crecer en sustratos con conductividad de hasta  $6 \text{ dS m}^{-1}$  (Harris-Valle et al., 2017) y *Lactuca sativa* inoculada con HMA logra tolerar hasta  $4.19 \text{ dS m}^{-1}$  en ambos casos aliviando el estrés salino y aumentando la capacidad de adquirir N, Ca y K (Vicente-Sánchez et al., 2014; Wazny et al., 2018).

El uso de microorganismos como los HMA, brindan beneficios frente a diferentes tipos de estrés que se generan en las plantas provocados por la salinidad y metales pesados. Mediante mecanismos de fitoextracción la planta absorbe los metales pesados, no obstante, los HMA atrapan a estos elementos en sus estructuras permitiendo un mejor desarrollo de la especie vegetal. Con estos antecedentes se planteó en esta investigación estudiar la absorción del Na y Pb en plantas de Cucurbitáceas inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares.

## 1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

En la zona costera de Santa Elena y el resto del país se produce una gran cantidad de Cucurbitáceas comerciales un ejemplo claro es el cultivo de melón (*Cucumis melo*) y sandía (*Citrullus lanatus*), además crece también la especie endémica conocida como alamama (*Cucurbita ecuadoriensis*) estos cultivos sufren un deterioro, por la salinidad de los suelos y de otros elementos químicos provocadas por el exceso de agroquímicos, fertilizantes y mala tecnificación agrícola (Casares et al., 2015).

En la producción de hortalizas como melón y sandía se aplican frecuentemente fertilizantes completos y simples que tienen valores detectables de Pb de hasta 21,5 ppm, y otros elementos con el Cd siendo las concentraciones de estos elementos altos en fertilizantes provenientes de fuentes fosfatadas (Martí et al., 2002). Los metales pesados al igual que el sodio producen efectos no deseados en los cultivos hortícolas. En este sentido la microbiota benéfica presente en el hábitat puede ser una alternativa para mitigar tales efectos nocivos en estos cultivos, como es el caso de los HMA microorganismos que brindan a las plantas tolerancia a los factores bióticos y abióticos permitiendo tener un desarrollo normal (Hashem et al., 2016; Zhang et al., 2018). Es importante mencionar que existe diversidad y abundancia de HMA en los suelos rizosféricos del país (Camenzid et al., 2016; Moina-Quimí et al., 2018). Además, cabe mencionar que las Cucurbitáceas son micorrizadas con facilidad, aunque existe pocos estudios de la interacción entre HMA y esta familia de plantas.

## 1.2 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la absorción de Na y Pb sobre Cucurbitáceas bajo condiciones controladas.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el nivel de tolerancia en el desarrollo de Cucurbitáceas a diferentes concentraciones de Na y Pb bajo condiciones controladas.
- Cuantificar la absorción Na y Pb en plantas de Cucurbitáceas crecidas en sustrato contaminados e inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares bajo condiciones controladas.

## 1.4 MARCO TEÓRICO

### Estrés abiótico producido por el sodio (Na) y plomo (Pb) en Cucurbitáceas

El estrés abiótico en plantas causado por Na en Ecuador se presenta en la zona costera debido a su génesis, mientras que para el Pb esta se ve influenciada por la actividad antropogénica y por trazas químicas provenientes de fertilizantes y agroquímicos o efluentes con altos contenidos de este metal, tal como se observa en los fertilizantes fosfatados en la tabla 1 (González et al., 2016). La escasez de agua incrementa los niveles de salinidad presente en el suelo, una propuesta para paliar estos efectos negativos es el uso de biofertilizantes a base de HMA dado que la simbiosis generada entre plantas y estos microorganismos, mejora notablemente el establecimiento, el vigor, la productividad y la supervivencia de las plantas bajo estrés (Harris-Valle et al., 2017). En la actualidad existen gran interés por la caracterización de especies nativas de HMA ya que estas son consideradas más eficientes que hongos no autóctonos (Bothe et al., 2010). Los HMA brindan respuestas a la salud de suelos cultivados, razón por la cual, son un factor esencial en el análisis macroecológicos futuros de los cultivos de importancia comercial (Menzel et al., 2016). En suelos con altos contenidos de Na y Pb se reduce la capacidad agrícola, pero el uso HMA podría ayudar ante esta problemática (Harris-Valle et al., 2017). Los HMA son una herramienta biotecnológica que podrían fitoestabilizar el contaminante y permitir que las plantas toleren altos niveles de Na y Pb. La aplicación de HMA nativos inoculados en plantas de maíz (*Zea mays*) han demostrado ser eficaces en la homeostasis y se correlacionan con la expresión de genes (ZmAKT2, ZmSOS1 y ZmSKOR) (Estrada et al., 2013; Yang et al., 2015; Yang et al., 2016; Wang et al., 2018).

**Tabla 1. Contenido de Pb en los fertilizantes.**

Fertilizantes	Pb ppm
<b>Intervalo de confianza: 95%</b>	
Fosfatado	10,974 ± 1,335
Nitrogenado	4, 656 ± 2,218
Fertirriego	no contienen
General	9,551 ± 1,505
<b>Intervalo de confianza: 99%</b>	
Fosfatado	10,974 ± 1,932
Nitrogenado	4, 656 ± 3,458
Fertirriego	no contienen
General	9,551 ± 1,267

Fuente: (Martí et al., 2002)

### 1.4.1 Na en las plantas

El Na es absorbido por las raíces y tallos de las plantas para ciertas funciones vitales, como no es un nutriente esencial este se acumula en las hojas, en niveles tóxicos y produce quemazón en el borde de la lámina foliar, los síntomas se pueden observar en respuesta a las condiciones cálidas y secas, iniciando en las hojas más viejas, este elemento afecta de forma directa al crecimiento y causa desequilibrios nutricionales con el calcio, potasio y magnesio, además logra degradar la condición física del suelo (Grattan et al., 2006), el Na produce además una disminución de la biomasa en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*) y haba (*Vicia faba*) causando grandes pérdidas de producción (Hanson et al., 1999; Hussein et al., 2017); sin embargo, existen plantas como la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) que pueden resistir altas concentraciones de sales al ser inoculadas con los HMA (Elhindi et al., 2017).

El Na representa el elemento que más causa toxicidad en las plantas porque compite con K por lugares de unión dentro de la membrana plasmática, anatómicamente afecta los tejidos causando quemazón a nivel del borde de la hoja. La supresión de la acumulación de Na aumentaría las actividades fisiológicas y metabólicas relacionadas con la fotosíntesis, respiración, regulación osmótica y la defensa antioxidante (Yang et al., 2014). Es indudable que las plantas pueden sufrir el efecto combinado del estrés por acumulación Na y otros elementos.

### 1.4.2 Pb en las plantas

El Pb no está reportado como un nutriente esencial para las plantas, es un contaminante que se incrementa por la actividad antropogénica. La absorción del Pb es regulada por el pH, capacidad de intercambio catiónico y el tipo de suelo, en niveles tóxicos causa retraso del crecimiento y ennegrecimiento del sistema radicular, tales síntomas suceden debido a que el Pb inhibe la fotosíntesis, el balance hormonal, agua y estructura de la membrana celular (Sharma et al., 2005). Por ejemplo, se han realizado estudios con Pb en plantas de papas (*Solanum tuberosum*) encontrando una mayor cantidad de Pb concentrada en los tubérculos y afectando su crecimiento (Pozo et al., 2011; Tintin et al., 2013).



### 1.4.3 Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) como una estrategia biotecnológica para el manejo de estrés abióticos en plantas.

Los HMA se relacionan con la mayoría de las plantas terrestres, las plantas obtienen diversos beneficios contra el estrés biótico y abiótico, también estudios en genómica han evidenciado una mejor comprensión de la evolución simbiótica con ciertas familias de plantas vasculares (huésped) donde resulta complejo su estudio y de gran utilidad en el entorno agrícola (Kamel et al., 2017). La capacidad fisiológica de adaptación que aportan los HMA a las plantas pueden solucionar el manejo de los problemas de contaminación, estos se muestran como un bioindicador de biodiversidad microbiana, además permiten recuperar suelos y ambientes erosionados por el uso excesivo de la agricultura (Aguirre et al., 2012). En sistemas productivos se ha comparado la aplicación de la fertilización orgánica y mineral, resultando mejor la primera gracias al aporte de los HMA (Zubek et al., 2012).

La dependencia simbiótica de los HMA con las plantas se incrementa con el nivel de estrés abiótico presente, la interacción mejora la fotosíntesis, ayuda al control de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yang et al., 2015) y mejora las características físicas y químicas del suelo produciendo glomalina proteína que ayuda a mejorar la textura del suelo (Malekzadeh et al., 2016). Las plantas producen en las raíces las hormonas conocidas como strigolactonas derivadas de los carotenoides, estas son exudadas para inducir el metabolismo energético y promoven la ramificación de las hifas de los HMA, estos hongos poseen también una amplia capacidad de adaptación genética y plasticidad fisiológica; puesto que, algunas especies de HMA sobreviven a los ambientes extremos y la dependencia se ve influenciada positiva o negativamente según sea el tipo de estrés producido (Kobae et. al., 2018).

Se ha determinado un impacto sinérgico entre microorganismos de la rizósfera; por ejemplo, *Bacillus subtilis* y HMA promueven mayor biomasa vegetal, probablemente por la osmorregulación de glicina, betaina, prolina y fenoles (Cicatelli et al., 2010) y la producción de fósforo fúngico por parte de los HMA necesario para la planta (Bago et al., 2003; Van Aarle et al., 2005). La conformación de comunidades micorrízica pueden influenciar en el tipo de textura y estructura del suelo, así mismo la diversidad de HMA está muy relacionada con una alta diversidad funcional que normaliza las interacciones entre las comunidades de HMA y de plantas logrando ser positivas o negativas (Martínez et al., 2009), razón por la cual, las plantas micorrizadas mejoran la calidad y supervivencia sobre todo para las plantas provenientes de cultivo *In vitro* (Singh et al., 2012); por lo tanto, varias especies de HMA tales como: (*Gigaspora margarita* y *Claroideoglossum lamellosum*) pueden ser inoculadas para promover la tolerancia al estrés y promoción del crecimiento vegetativo (Selvakumar et al., 2016).

## CAPÍTULO 2

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Ubicación del sitio experimental

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biorremediación Ambiental del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, ubicado en el campus Gustavo Galindo de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) durante los meses de abril a noviembre del 2017.

#### 2.1 Obtención del material biológico

##### Material vegetal

Las semillas comerciales utilizadas fueron melón (*Cucumis melo*) variedad Edisto y sandía (*Citrullus lanatus*) variedad Charleston Grey, las semillas silvestres de alamama (*Cucurbita ecuadoriensis*) y zapallo (*Cucurbita moschata*) fueron colectadas en la zona rural de Juan Gómez Rendón conocido como “Progreso” cantón Guayaquil en la provincia del Guayas.

##### Obtención del preinóculo de HMA

El consorcio de HMA utilizado procede del banco de hongos micorrícicos arbusculares que posee el área de Biorremediación Ambiental del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL), el mismo que está conformado por seis géneros de HMA tales como: *Acaulospora*, *Ambispora*, *Diversispora*, *Entrophospora*, *Funeliiformis* y *Glomus*.

##### Preparación del inóculo de HMA

Una vez seleccionado el consorcio se procedió a la producción masiva del inóculo mediante el sistema de plantas trampas (Reyes et al., 2016), utilizando fréjol (*Phaseolus vulgaris*), braquiaria (*Brachiaria brizantha*) y marigol (*Tagetes erecta*), crecidas en un sustrato con 70% de arena, 15% tamo de arroz molido y 15% de turba (Andrango et al., 2016), a los cuatro meses de haber realizado la siembra se sometieron las plantas a estrés hídrico para propiciar la esporulación. El sustrato se tamizó y fue usado posteriormente en dosis de 200 g (Tovar-Franco et al., 2006; Osorio et al., 2008; Parniske et al., 2008), se realizaron observaciones de infección micorrízica a los 21 y 52 días después del trasplante.

## 2.2 Diseño experimental

Se usó un diseño bifactorial con interacción para las cuatro especies de Cucurbitáceas, donde se establece cinco niveles del factor Na y cinco niveles del factor Pb con seis réplicas en cada nivel evaluado para las variables de respuestas del primer ensayo sin HMA: altura, número de hojas, área foliar y biomasa, cuantificación de la absorción de Pb y Na, posteriormente para el segundo ensayo con HMA se evaluó las siguientes variables de respuestas: altura, número de hojas, área foliar, clorofila, porcentaje de micorrización, biomasa seca y cuantificación de la absorción de Pb y Na.

Modelo estadístico para el diseño bifactorial del primer ensayo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

$i= 1, 2, 3, 4, 5$

$j= 1, 2, 3, 4$

$k= 1, 2, 3, 4, 5, 6$

Modelo estadístico para el diseño bifactorial del segundo ensayo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

$i= 1, 2, 3, 4, 5$

$j= 1, 2$

$k= 1, 2, 3, 4, 5, 6$

## 2.3 Condiciones del sistema

Las plantas fueron trasplantadas en un sustrato compuesto por tamo y arena en proporción 1:1, el sustrato contenía una conductividad eléctrica de 0.441 dS m<sup>-1</sup> y pH 6.98. Establecidos los ensayos las plantas fueron regadas con la solución modificada de Steiner ver anexos (Tabla 7) (Galindo et al., 2014), la misma contenía: 2, 4, 8, 12 y 16 dS m<sup>-1</sup> de conductividad eléctrica de cloruro de sodio (NaCl) y 0, 150, 250, 500, y 1000 ppm de nitrato de plomo Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, el sustrato se mantuvo a capacidad de campo con tres aplicaciones a la semana de 70 ml de las soluciones antes mencionadas (Barraza et al., 2012). Se realizaron mediciones de pH y conductividad eléctrica (Figura 15 y 16) según lo recomendado por Naranjo et al. (2014) para estas especies.

## Imbibición de semillas de Cucurbitáceas en soluciones de Na y Pb y su respuesta en la germinación.

Se tomó cien semillas de cada Cucurbitáceas y se las sumergió a las concentraciones 2, 4, 8, 12 y 16 dS m<sup>-1</sup> de conductividad eléctrica para Na y 0, 150, 250, 500, y 1000 ppm de Pb durante 48 horas, luego fueron sembradas en bandeja de germinación donde se evaluó el porcentaje de germinación hasta la emisión de la primera hoja verdadera.

### 2.4 Ensayo de crecimiento de las cuatro especies de Cucurbitáceas en presencia de Na y Pb.

Una vez germinadas las semillas se trasplantó seis plántulas por cada tratamiento que fueron contemplados en el ensayo (Tabla 2), el sustrato se mantuvo a capacidad de campo dentro del sistema. A lo largo del ensayo las plantas fueron regadas con las soluciones de los dos elementos estudiados Na y Pb.

**Tabla 2. Diseño bifactorial para las Cucurbitáceas evaluadas con Na y Pb.**

	CEC	CME	CMO	CLA
Na (dS m <sup>-1</sup> )	2	2	2	2
	4	4	4	4
	8	8	8	8
	12	12	12	12
	16	16	16	16
Pb (ppm)	0	0	0	0
	150	150	150	150
	250	250	250	250
	500	500	500	500
	1000	1000	1000	1000

CEC= alamama CME= melón, CMO= zapallo y CLA = sandía.

## **Parámetros a evaluar**

### **Altura y número de hojas**

La altura y número de hojas fueron medidos una vez por semana. En el caso de la altura se utilizó una regla de 60 cm, midiendo desde el cuello de la planta hasta la yema terminal; mientras que, el número de hojas se evaluó según la emisión foliar semanal (Alam et al., 2015).

### **Área foliar**

Al finalizar cada ensayo se tomó la hoja 6, 7 y 8 de todos los tratamientos, cada muestra fue etiquetada. Posteriormente se procedió a escanear las hojas de los tratamientos, en formato JPG, para luego determinar el área foliar usando el software de imágenes ImageJ (Guerrero et al., 2012).

### **Biomasa seca**

Las plantas fueron secadas en una estufa durante 24 horas a 65 °C posteriormente pesadas en una balanza analítica; y etiquetadas en fundas plásticas. Obtenido el peso seco constante se trituraron por separado la biomasa aérea y radicular en una licuadora doméstica (Ali et al., 2013; Vaca et al., 2016).

En este ensayo se buscó preseleccionar el material vegetal que mejor respuesta diera a los elementos estudiados Na y Pb, siendo CEC y CME las especies con características de tolerancia y susceptibilidad. Los mismos que fueron evaluados en un segundo experimento en presencia de HMA.

## **2.5 Crecimiento de *Cucurbita ecuadoriensis* y *Cucumis melo* en sustratos con Na y Pb e inoculadas con HMA.**

En este ensayo se realizó un diseño bifactorial con interacción para las especies CEC y CME (Tabla 3), las plantas al tener dos hojas verdaderas fueron trasplantadas en las fundas respectivas. Al momento del trasplante fueron inoculadas con 200 g de HMA luego fueron regadas y evaluadas una vez por semana las variables de respuesta: altura, número de hojas, área foliar, clorofila, porcentaje de micorrización, biomasa seca y finalmente absorción de Pb y Na (Figura 1).



**Figura 1.** Biometría de Cucurbitáceas: A-B) Germinación de alamama y melón; C) Toma de datos número de hojas; D) Altura; E) Clorofila; F) Lectura de conductividad y pH; G) Medición de área foliar; H) Lectura en espectrofotómetro de absorción atómica.

Los parámetros de altura, número de hojas, área foliar y biomasa seca fueron conducidas de la misma manera como en el ensayo antes descrito, cabe mencionar que no se realizaron modificaciones a las metodologías descritas para estas variables.

**Tabla 3. Diseño bifactorial para las Cucurbitáceas evaluadas con Na y Pb inoculadas con HMA.**

	CEC	CME
	2	2
Na (dS m <sup>-1</sup> )	4	4
	8	8
	12	12
	16	16
	0	0
Pb (ppm)	150	150
	250	250
	500	500
	1000	1000

CEC= alamama CME= melón.

## Clorofila

Al finalizar el ensayo con HMA se midió la clorofila en la hoja 5, mediante un método no destructivo usando el medidor CCM-200 PLUS, Opti-Science (Callejas et al., 2013).

## Colonización de raíces de CEC y CME

A los 21 y 52 días se tomó raicillas secundarias de las plantas evaluadas de cada especie sometida a Pb y Na para observar y cuantificar el porcentaje de micorrización.

## Tinción de raíces

Las raíces de cada Cucurbitácea fueron tomadas al final del experimento para evidenciar la presencia o ausencia de hifas, vesículas o arbusculos. Los pasos a seguir consistieron en seleccionar raíces secundarias y ponerlas en un vaso de vidrio autoclavable sumergidas en hidróxido de potasio al 10% por 10 minutos a 121 °C y a 15 lb de presión. Luego se lavó el hidróxido de potasio con agua de la llave, posteriormente adicionando 1% de ácido clorhídrico y se dejó reposar por 3 minutos, después se retiró el ácido clorhídrico para agregar finalmente azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol y autoclavar por 15 minutos. Una vez autoclavadas las raíces se realizó el montaje en portaobjetos y se observó al microscopio usando el objetivo de 40x.

## Porcentaje de micorrización

Realizado el protocolo de tinción y montaje de las raíces en el portaobjeto se observaron los campos de cada raíz para luego determinar el porcentaje de micorrización en cada especie de Cucurbitácea estudiada, según la fórmula propuesta por McGonigle (1990).

$$\% \text{ Micorrización} = \frac{\text{N campos infectados \{Hifas, Vesículas, Arbusculos\}}}{\text{\{Total de campos observados\}}} \times 100$$

## Cuantificación de Pb y Na por absorción atómica en la biomasa seca de alamama (*C. ecuadoriensis*) y melón (*C. melo*).

A partir de la biomasa seca se procedió a pesar 0.5 g de tejido foliar y radicular el mismo que fue digerido con 6 ml de ácido nítrico al 65% y 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, luego colocados en un digestor de microondas a 200 °C ver anexos (Figura 17). Digerida la muestra se procedió analizarla en un espectrofotómetro de absorción atómica, previo se realizó una curva de calibración usando las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 8, 12, y 20 ppm de Pb, ver anexos (Figura 18) (Lebeau et al., 2008; Luna et al., 2010; Ribeiro et al., 2012).

En el caso de Na las muestras fueron enviadas para su análisis al laboratorio de agua y suelos del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) estación litoral sur.

## Determinación de factores de bioconcentración y de translocación

El factor de bioconcentración (FBC) es estimado por la concentración del elemento absorbido en la planta sobre la concentración presente en el suelo, mientras que el factor de translocación (FT) se estima a partir de la concentración del elemento absorbido en la biomasa aérea dividido para la concentración del elemento obtenido en la biomasa radicular (Niu et al., 2007; Maldonado-Magaña et al., 2011; Ali et al., 2013), esto se realizó para ambos elementos Na y Pb (Cerdeira et al., 1995).

$$\text{FBC} = \frac{\{\text{elemento total de planta}\}}{\{\text{elemento en el suelo}\}} \qquad \text{FT} = \frac{\{\text{elemento en parte aérea}\}}{\{\text{elemento en parte radicular}\}}$$

## 2.6 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en el software estadístico Infostat versión 2017e para el análisis de las variables de respuesta se tomó los datos de la séptima semana de evaluación, donde se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de contraste de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para identificar si existe diferencias estadísticas entre los tratamientos.

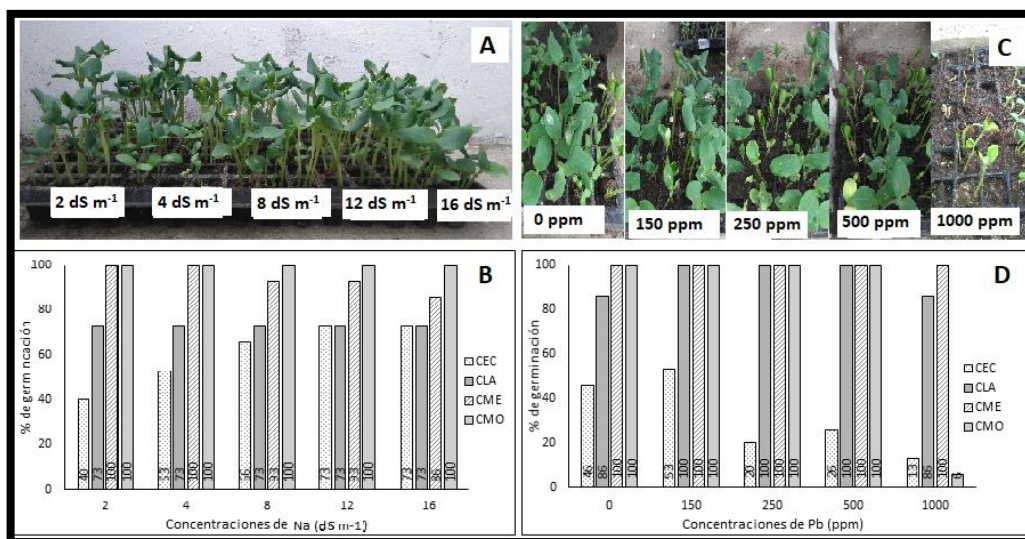


## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Efecto de la imbibición de Cucurbitáceas silvestres y comerciales bajo concentraciones de Pb y Na.

Los resultados del porcentaje de germinación de las semillas hidratadas en soluciones nitrato de plomo evidenció que *Cucumis melo* (CME), *Citrullus lanatus* (CLA) y *Cucurbita moschata* (CMO) alcanzan un alto porcentaje de germinación entre 80 y 100% en los niveles de 150, 250 y 500 ppm de Pb respecto al control sin Pb que alcanzó 100% de germinación tal como se observa en la figura 2 y anexos (Tabla 8 y figura 19); mientras que *Cucurbita ecuadoriensis* (CEC) alcanzó un porcentaje de germinación entre 20 y 53% en 1000 ppm de Pb, las especies más afectadas fueron CEC y CMO, resultado similares de inhibición en la germinación provocada por altas concentraciones de Pb han sido reportados en otras especies como el maíz (*Zea mays*) y fréjol (*Phaseolus vulgaris*) (Malkowski et al., 2005; Sengar et al., 2008; Guzmán et al., 2013).



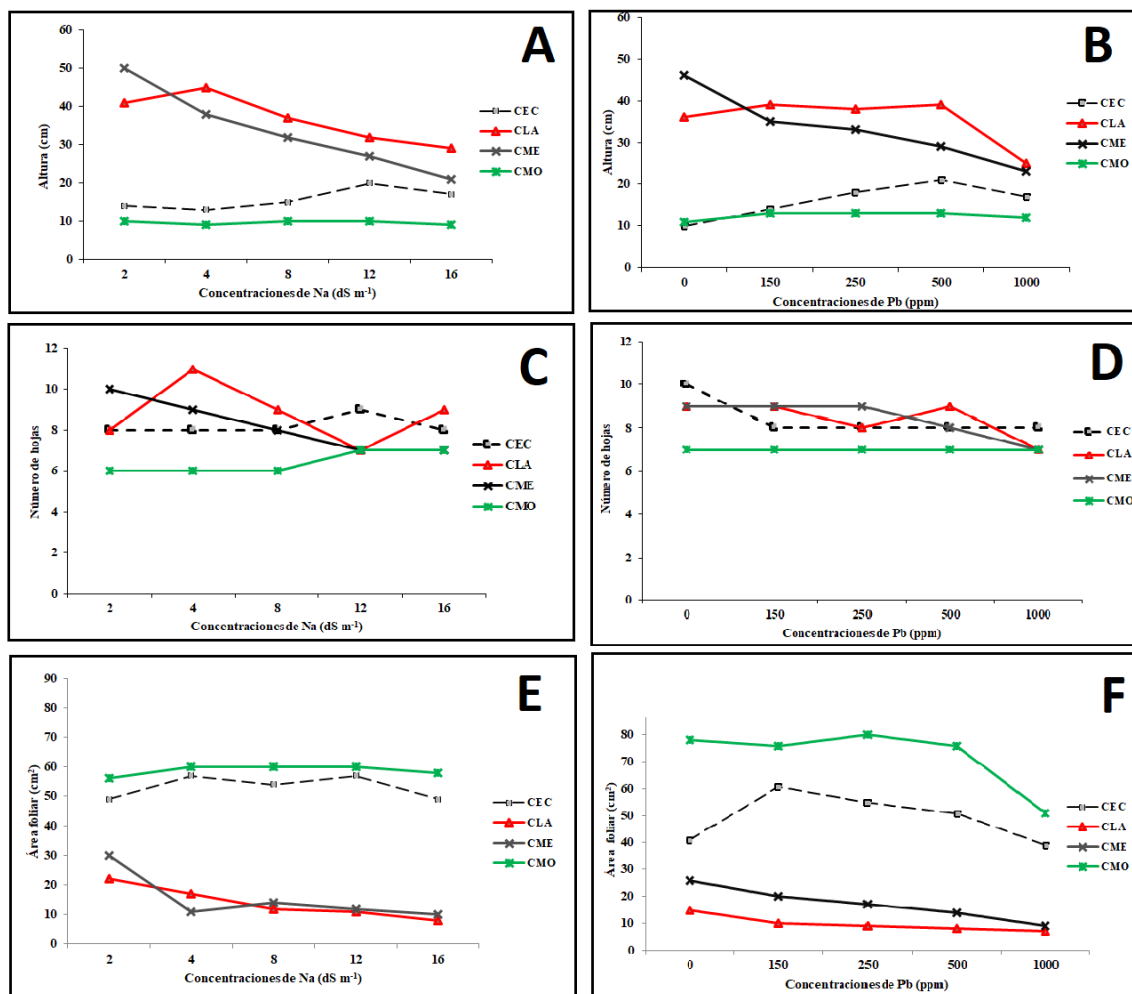
**Figura 2.** Experimento de imbibición utilizando semillas de Cucurbitáceas en diferentes concentraciones de nitrato de plomo y cloruro de sodio: A) Plantas germinadas en Na; B) % de germinación a los 12 días en NaCl; C) Plantas germinadas en Pb; D) % de germinación a los 12 días en Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

La imbibición de las semillas de las cuatro Cucurbitáceas con cloruro de sodio no presentaron inhibición a la germinación en las concentraciones utilizadas (2, 4, 8, 12, 16 dS m<sup>-1</sup>), las semillas germinaron de manera óptima ver anexo (Tabla 9 y figura 20). Estos resultados concuerdan con los reportados por Xu et al. (2017) quienes observaron que no existe inhibición en la germinación del cultivo

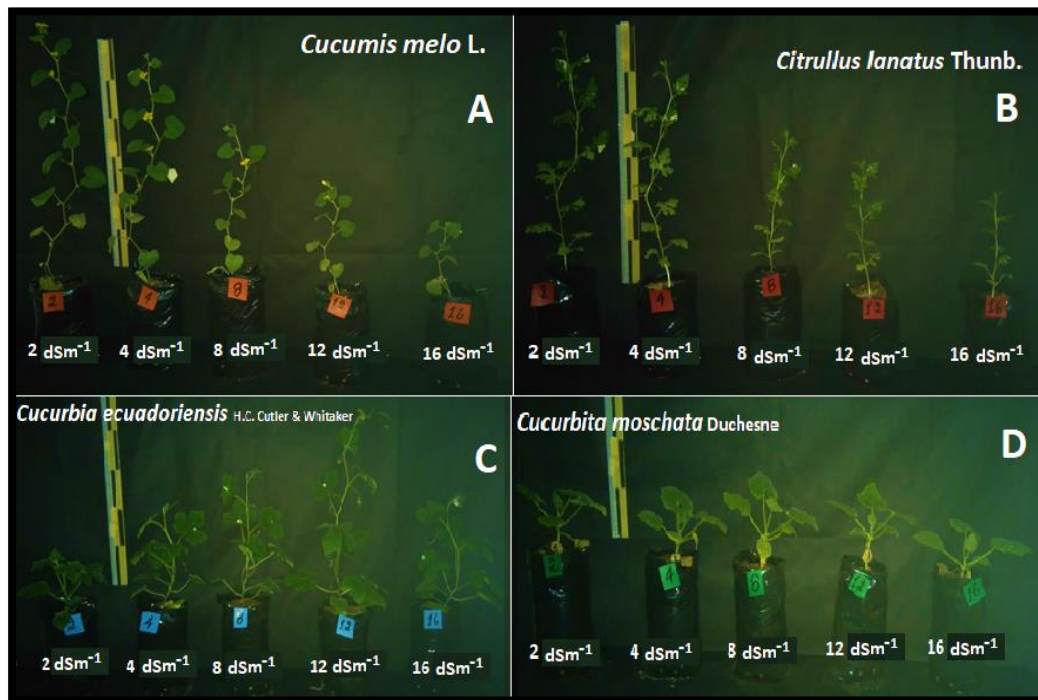
de melón al crecer en un sustrato con diferentes concentraciones de sales, en semillas de pepino (*Cucumis sativus*) se menciona que la melatonina alivia los efectos inhibidores del estrés por Na en la germinación, mediante la regulación de la biosíntesis y el catabolismo del ácido abscísico y ácido giberélico (Zhang et al., 2014).

### 3.2 Efecto del Pb y Na en el crecimiento de Cucurbitáceas.

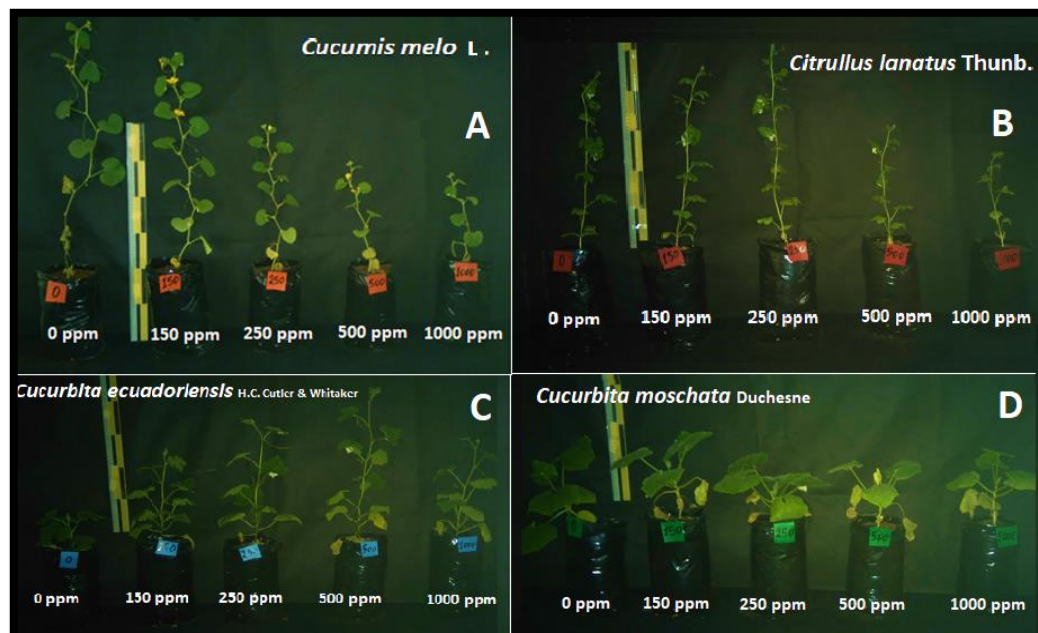
En los parámetros agronómicos de altura, número de hojas y área foliar los resultados evidencian un efecto negativo para CLA y CME al aumentar las concentraciones de Na y Pb; mientras que CEC y CMO no se vieron afectadas por las concentraciones de los dos elementos estudiados, por el contrario se observó un efecto positivo en el desarrollo de las plantas; sin embargo, concentración de 1000 ppm de Pb y 16 dS m<sup>-1</sup> de Na, se ven afectadas las especies de CEC y CMO (Figuras 3, 4, 5 y tablas 10, 11), efectos negativos similares fueron reportados en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa*) al crecer en concentraciones altas de Pb y Na afectando su desarrollo (Mnasri et al., 2017), En las variables antes mencionadas las especies CLA y CME fueron las más afectadas por la acción del Pb, es importante mencionar que el número de hojas aumenta; mientras que, el área foliar disminuye en un 25%. En las especies silvestres CEC y CMO se observó tolerancia hasta 500 ppm de Pb al no afectar la altura y área foliar; sin embargo, en el número de hojas se mantiene constante para ambas especies, estos resultados concuerdan con los reportados por Naranjo et al. (2014) quienes observaron que CEC y CMO son tolerante a la salinidad de hasta 12 dS m<sup>-1</sup>. Manousaki et al. (2009) mencionan que a mayor concentración de salinidad los metales como el Cd ingresan fácilmente a la planta, pero aún no está claro este mecanismo en Pb. Los resultados de este trabajo demuestran el efecto individual del elemento más no la interacción de ambos. Peng et al. (2016) mencionan que la salinidad incrementa los niveles de sacarosa en plantas tolerantes y susceptibles en concentraciones de 11.46 dS m<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Parámetros evaluados con diferentes concentraciones de Na y Pb; A-B) alturas de las cuatro especies crecidas en sustratos con Na y Pb; C-D) número de hojas en sustratos con Na y Pb; E-F) áreas foliares evaluadas en sustrato contaminado por Na y Pb. Las diferencias significativas encontradas en estos análisis se detallan en la tabla 9 y 10.



**Figura 4.** Tratamientos evaluados con diferentes concentraciones de Na; A) plantas de melón; B) sandía; C) alamama; D) zapallo; desarrollados en sustratos con Na durante 52 días.



**Figura 5.** Tratamientos evaluados con diferentes concentraciones de Pb; A) cultivo de melón; B) sandía; C) alamama; D) zapallo; crecidos en sustratos con Pb durante 52 días.

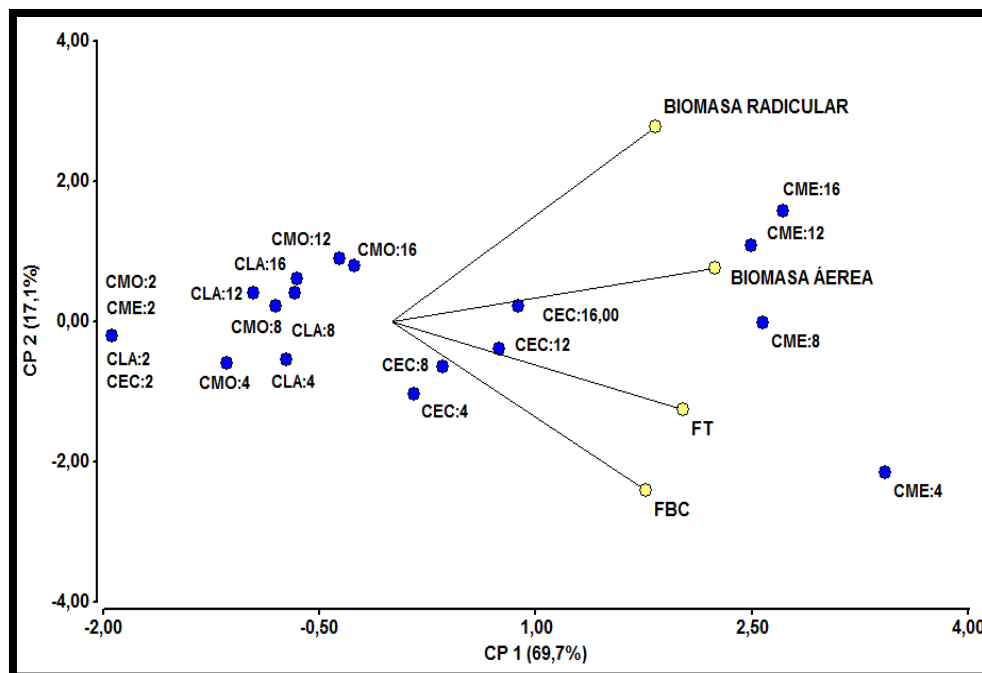
Los resultados en cuanto a la biomasa seca total (BST) obtenida en las plantas que crecieron con Na y Pb corroboran los resultados antes mencionados, la que obtuvo mayor biomasa fue la especie silvestre CEC; mientras que, la menor biomasa fue obtenida por CLA en Na y Pb, tal como se demuestra en la tabla 4. Shu et al. (2015) mencionan que la reducción en la biomasa se debe a la alta toxicidad de NaCl que afecta la fotosíntesis. Así mismo el Pb presente en el suelo inhibe el crecimiento y la actividad fotosintética en plantas mediante la inducción del estrés oxidativo (Kaur et al., 2012; Ortas et al., 2017). Además, estos resultados demuestran que el Na es más tóxico para las plantas que el Pb, debido a la solubilidad y ruta de ingreso al sistema de la planta, razón por la cual, se demuestra una drástica diferencia en los niveles de materia seca.

**Tabla 4. Biomasa seca generada por los cuatros especímenes vegetales de Cucurbitáceas crecidas en sustratos con diferentes concentraciones de Na y Pb.**

Especies	Elementos evaluados			
	Sodio (Na)		Plomo (Pb)	
	Tratamientos (dS m <sup>-1</sup> )	BST (g/planta)	Tratamientos (ppm)	BST (g/planta)
CEC	* 2	2,18 ± 0,66 <sup>F</sup>	* 0	2,18 ± 0,75 <sup>F</sup>
	4	2,94 ± 0,42 <sup>F</sup>	150	3,02 ± 0,53 <sup>G</sup>
	8	3,65 ± 0,78 <sup>G</sup>	250	3,18 ± 0,58 <sup>G</sup>
	12	3,47 ± 1,16 <sup>G</sup>	500	3,25 ± 0,56 <sup>G</sup>
	16	3,31 ± 0,41 <sup>F</sup>	1000	2,79 ± 0,38 <sup>G</sup>
CLA	* 2	1,43 ± 0,41 <sup>C</sup>	* 0	0,87 ± 0,12 <sup>A</sup>
	4	1,35 ± 0,49 <sup>C</sup>	150	1,12 ± 0,23 <sup>B</sup>
	8	1,07 ± 0,21 <sup>B</sup>	250	1,59 ± 0,41 <sup>D</sup>
	12	0,78 ± 0,31 <sup>A</sup>	500	0,95 ± 0,23 <sup>A</sup>
	16	0,69 ± 0,19 <sup>A</sup>	1000	0,62 ± 0,16 <sup>A</sup>
CME	* 2	2,14 ± 0,49 <sup>E</sup>	* 0	2,47 ± 0,46 <sup>G</sup>
	4	1,78 ± 0,53 <sup>D</sup>	150	2,12 ± 0,85 <sup>E</sup>
	8	1,75 ± 0,63 <sup>D</sup>	250	2,18 ± 0,37 <sup>F</sup>
	12	1,10 ± 0,27 <sup>B</sup>	500	1,54 ± 0,37 <sup>D</sup>
	16	0,82 ± 0,35 <sup>A</sup>	1000	1,33 ± 0,36 <sup>C</sup>
CMO	* 2	2,30 ± 0,66 <sup>F</sup>	* 0	2,92 ± 0,52 <sup>G</sup>
	4	2,00 ± 0,32 <sup>E</sup>	150	3,65 ± 0,62 <sup>H</sup>
	8	2,68 ± 0,51 <sup>F</sup>	250	3,06 ± 0,61 <sup>G</sup>
	12	2,83 ± 0,59 <sup>F</sup>	500	2,83 ± 0,40 <sup>G</sup>
	16	2,63 ± 0,44 <sup>F</sup>	1000	2,94 ± 0,49 <sup>G</sup>

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ ); ± desviación estándar; \* controles; BST= Biomasa Seca Total.

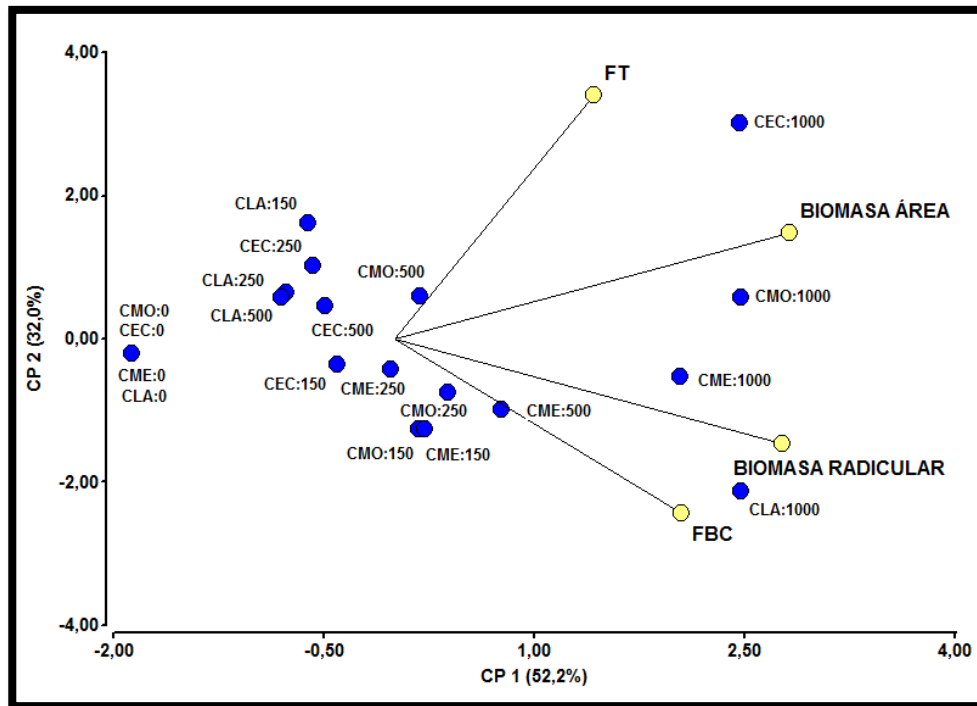
En lo que concierne a la absorción de Na se pudo observar que CME y CEC pueden acumular gran cantidad de Na en su biomasa aérea y radicular (Figura 6), se evidenció diferencias estadísticas significativas en las diferentes concentraciones de Na como se observa en la tabla 12. Al determinar los factores FBC y FT podemos observar que CME y CEC acumulan más Na que CLA y CMO, resultados similares han sido reportados en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) (Villa et al., 2006; Peng et al., 2016). En este contexto se ha reportado que existen proteínas como las acupurinas que participan en el movimiento del agua y controlan la absorción de este elemento, mecanismo que podría estar involucrado en la tolerancia de las plantas a la salinidad (Montes-Rentería et al., 2011; Wang et al., 2015).



**Figura 6.** Análisis de componentes principales usando cuatro variables para determinar la acumulación de Na en la biomasa (aérea y radicular) de Cucurbitáceas evaluadas durante siete semanas.

La acumulación de Pb en la biomasa seca de CEC y CME presentó un patrón similar a los observados en los parámetros agronómicos, encontrando diferencia estadística significativas entre los tratamientos en comparación al control una vez aplicando el test de Tukey ( $p < 0.05$ ). En la tabla 13 se observa que en la biomasa radicular se concentra mayor Pb que en la biomasa aérea conforme aumenta las concentraciones para todas las especies evaluadas; no obstante, se observa que, la planta que más concentra Pb en la raíz fue CLA con 16598.9 ppm al recibir 1000 ppm de Pb, valor superior al cuantificado en control que presentó 3.6 ppm. Además, se pudo observar que CEC es la especie que menos concentra Pb en raíz, pero concentra más en la biomasa aérea (Figura 7 y tabla 13); así mismo, la especie CEC obtuvo un factor de bioconcentración de 5.2 y

0.11 del factor de traslocación. Sidhu et al. (2018) mencionan que la concentración de Pb en plantas hiperacumuladoras alcanzan un máximo de 2513 ppm en biomasa aérea en plantas crecidas con 500 ppm de este elemento. Este resultado difiere al valor encontrado en esta investigación donde plantas de alamaña absorbieron 545.7 ppm de Pb en la biomasa aérea crecidas en sustrato con una concentración de 1000 ppm de Pb.



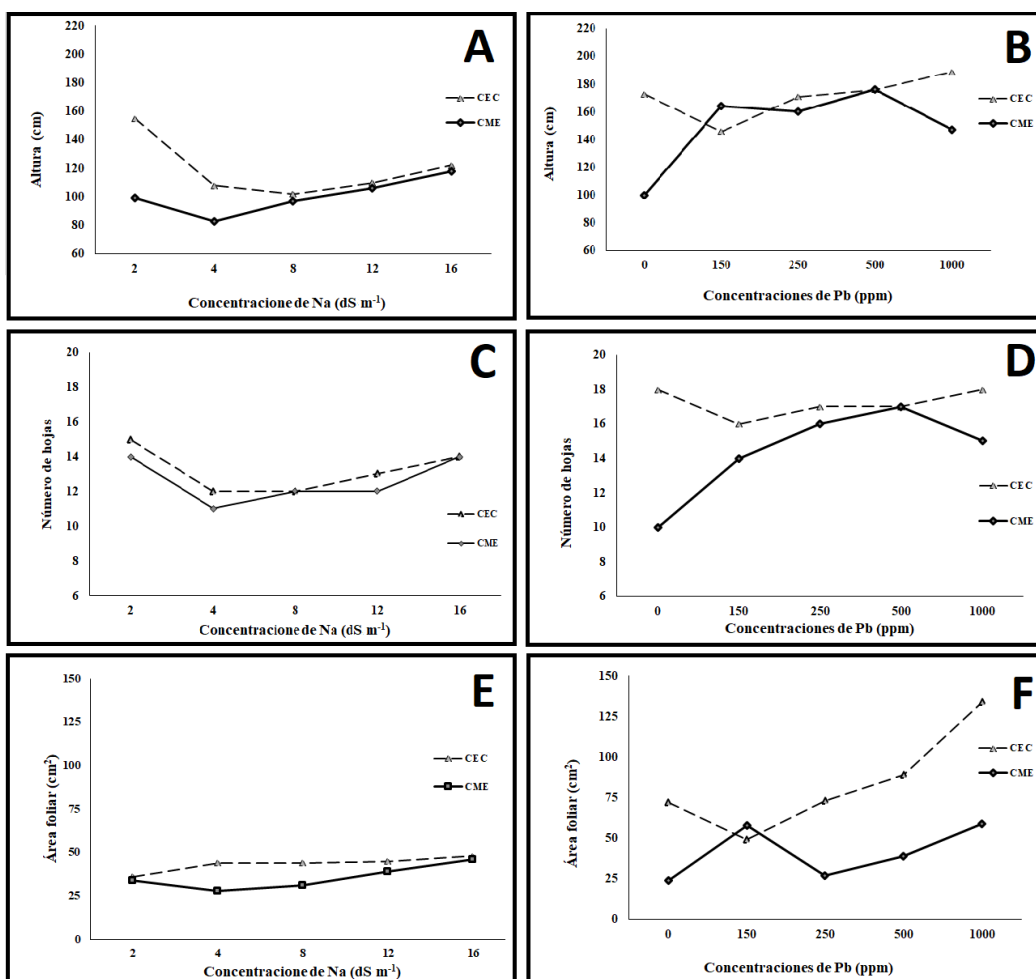
**Figura 7.** Análisis de componentes principales usando cuatro variables para determinar la acumulación de Pb en la biomasa (aérea y radicular) de Cucurbitáceas evaluadas durante siete semanas.

### 3.3 Efecto del Na y Pb en el crecimiento CEC y CME utilizando HMA.

Los resultados de la especie CEC y CME para ser evaluadas en presencia de Na y Pb e inoculadas con HMA se presentan a continuación. Los resultados demuestran que la especie CEC y CME registraron una altura de 122 y 118 cm al crecer en concentración de  $16 \text{ dS m}^{-1}$ , en comparación al nivel más bajo de salinidad ( $4 \text{ dS m}^{-1}$ ) que alcanzo 108 y 83 cm, mientras que para el número de hojas y área foliar no existieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y el control ver figura 8, 9 y tabla 14, estos resultados obtenidos se deben a la presencia de los HMA; dado que, ayudan a proteger la disrupción de los procesos enzimáticos (equilibrio iónico del citoplasma) mediados por potasio en condiciones de estrés salino (Giri et al., 2007; Chandrasekaran et al., 2016; Chen et al., 2017).

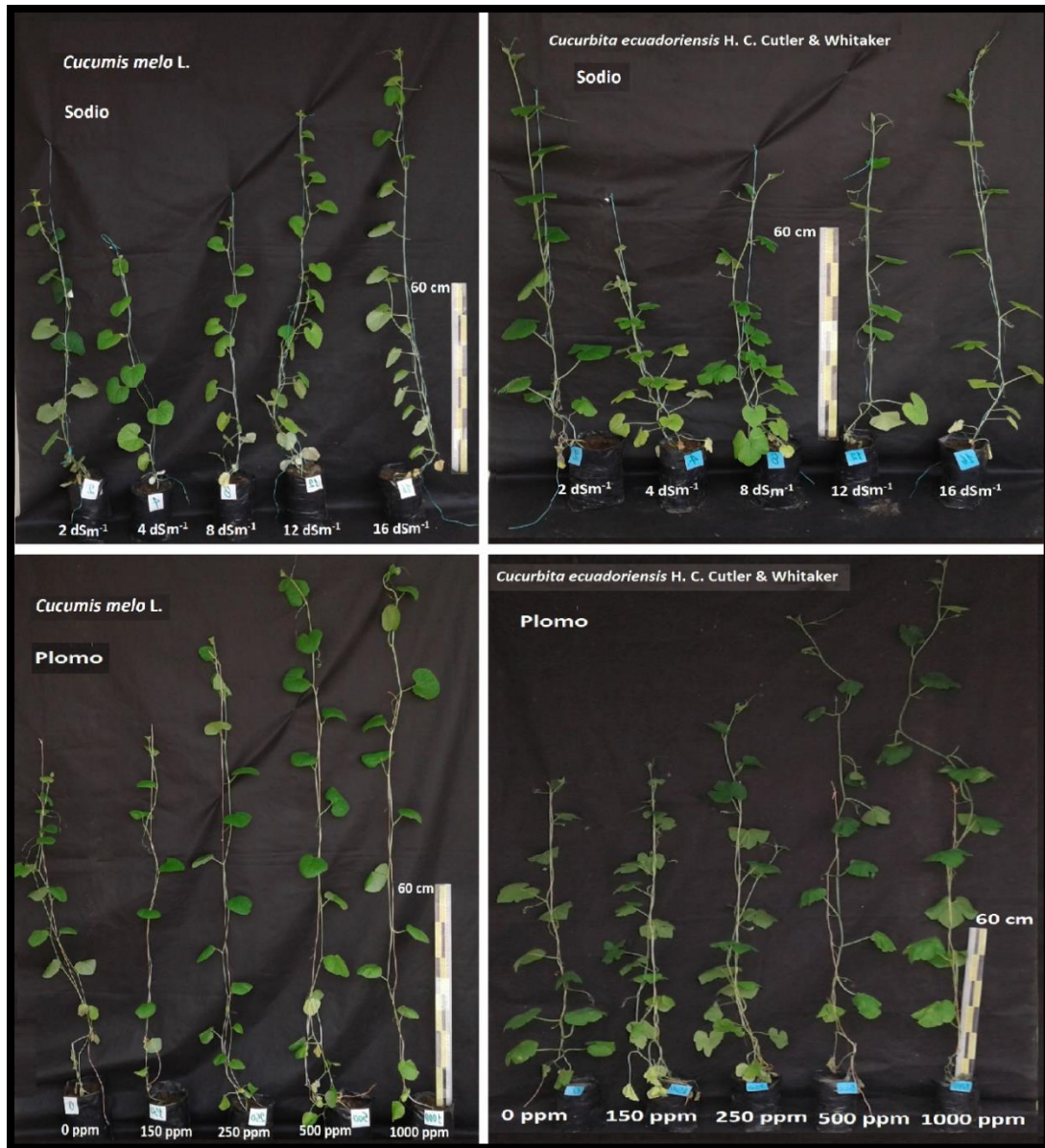


Los resultados concernientes a Pb en estas especies (CEC y CME) se lograron observar alturas de 189 y 147 cm al crecer en concentración de 1000 ppm de Pb en comparación al nivel más bajo (150 ppm) que alcanzó 146 y 164 cm respectivamente, mientras que número de hojas CEC no tuvo diferencias significativas en comparación a CME que tuvo mayor cantidad de hojas en concentración de 1000 ppm. Resultados superiores se han reportado en plantas micorrizadas de CLA presentando alturas superiores a los 300 cm (Salmerón et al., 2009; Chico et al., 2012).



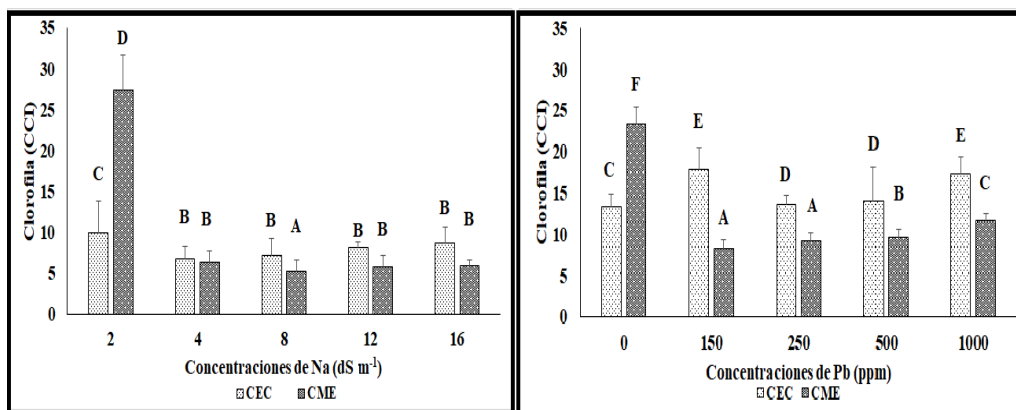
**Figura 8.** Parámetros evaluados con diferentes concentraciones inoculadas con HMA en alamama y melón: A-B) alturas evaluadas en sustratos contaminados con Na y Pb, C-D) número de hojas evaluado en sustratos contaminados con Na y Pb, E-F) áreas foliares evaluadas en sustratos contaminados con Na y Pb. Las diferencias significativas encontradas en estos análisis se detallan en la tabla 13.





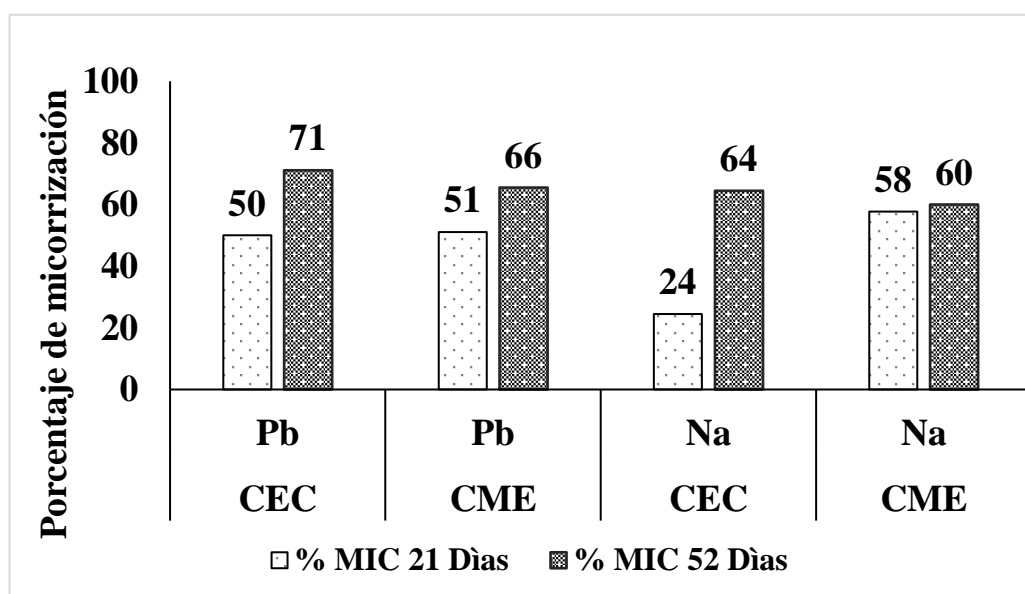
**Figura 9.** Desarrollo morfológico de las especies CEC y CME crecidas en sustratos contaminados por Na y Pb inoculadas con HMA a los 52 días de evaluación.

A los 52 días con el uso de HMA se obtuvo un incremento del 16% de la clorofila en CME y un 25% en CEC en concentración de 16 dS m<sup>-1</sup> respecto al nivel más bajo (4 dS m<sup>-1</sup>) de Na, mientras que en concentración de 1000 ppm de Pb se observaron incrementos de 41.4% (CME) y 2.8% (CEC) en las especies estudiadas en comparación a 150 ppm de Pb, finalmente podemos observar que el Na afecta más la clorofila comparado con Pb (Figura 10 y tabla 15), resultados similares en el contenido de clorofila se han observado en plantas fitoacumuladoras de Pb (*Chenopodium murale*) cuando crecen en sustratos con 500 ppm de Pb (Khaleghi et al., 2012; Frosi et al., 2017; Scharnagl et al., 2018; Sidhu et al., 2018).

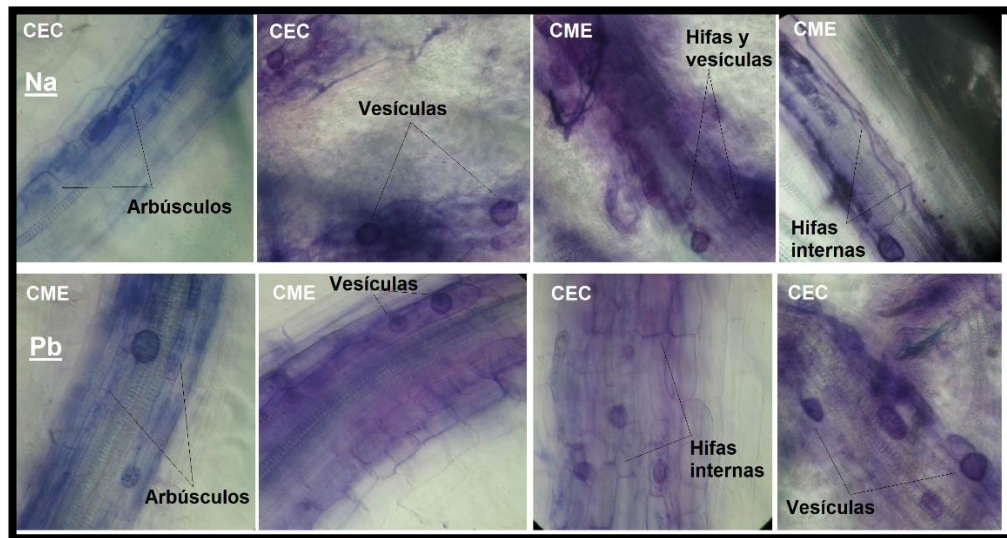


**Figura 10.** Contenido de clorofila en las especies CEC y CME crecidas en sustratos con diferentes concentraciones de Na y Pb evaluadas a los 52 días e inoculadas con HMA.

Las especies CEC y CME alcanzaron porcentajes de micorrización mayores al 50% a los 21 días, para los tratamientos que contenían Na y Pb (Figura 11), estos resultados son mayores a los reportados por De la noval et al., (1995), quienes obtuvieron a los 21 días un porcentaje de micorrización del 40% en cultivo *In vitro* de piñas. Al final de la experimentación (52 días) se observaron porcentajes de micorrización superiores al 60% (Figura 11 y 12), datos son similares a los reportados en plantas de uvilla (*Physalis peruviana*) y fréjol (*Phaseolus vulgaris*) al crecer en sustratos con altos contenidos de Na y Pb (Miranda et al., 2012; Chauhan et al., 2012; Neuenkamp et al., 2018). Adicionalmente estudios reportados en *Galactia smallii* se ha observado un incremento en la micorrización y esporulación de consorcios de HMA conforme al incremento del contaminante (Scharnagl et al., 2018).



**Figura 11.** Infección micorrícica inicial y final de las plantas de melón (CME) y alamama (CEC) crecidas en sustratos con diferentes concentraciones de Pb y Na.



**Figura 12.** Estructuras infectivas de los HMA observadas a los 52 días de experimentación con lente 40x en plantas de melón (CME) y alamama (CEC).

En lo que concierne a los resultados obtenidos en la biomasa seca de CEC alcanzó 2,49 g/planta en la concentración de 16 dS m<sup>-1</sup>; así mismo, CME obtuvo 1,93 g/planta; mientras que, en la concentración de 1000 ppm de Pb, se alcanzó 3,89 y 2,34 g/planta en CEC y CME respectivamente (Tabla 5). Resultados que concuerdan con lo manifestado por Yadav et al. (2013), quienes sostienen que las plantas inoculadas con HMA y crecidas en sustratos contaminados con Na y Pb logran una mejor aclimatación, supervivencia vegetal y biomasa; En este mismo contexto, Lermen et al. (2015), mencionan que las plantas micorrizadas con sustrato contaminado a 1000 ppm de Pb acrecientan su biomasa seca en un 50%. Resultados similares han sido observados en plantas de arroz (*Oryza sativa*) donde se ha promovido la biomasa vegetal usando HMA (Porcel et al., 2015).

**Tabla 5. Biomasa seca total obtenida en alamama (CEC) y melón (CME) crecidas en sustratos con diferentes concentraciones de Na y Pb e inoculadas con HMA.**

Especies	Elementos evaluados			
	Sodio (Na)		Plomo (Pb)	
	Tratamientos (dS m <sup>-1</sup> )	BST (g/planta)	Tratamientos (ppm)	BST (g/planta)
CEC	* 2	2,86 ± 0,77 <sup>C</sup>	* 0	4,11 ± 0,81 <sup>D</sup>
	4	1,70 ± 0,57 <sup>A</sup>	150	2,62 ± 0,42 <sup>C</sup>
	8	2,01 ± 0,31 <sup>B</sup>	250	3,00 ± 0,64 <sup>D</sup>
	12	2,05 ± 0,35 <sup>C</sup>	500	2,95 ± 0,88 <sup>C</sup>
	16	2,49 ± 0,49 <sup>C</sup>	1000	3,89 ± 1,09 <sup>D</sup>
CME	* 2	3,07 ± 0,65 <sup>C</sup>	* 0	1,05 ± 0,46 <sup>A</sup>
	4	1,99 ± 0,67 <sup>B</sup>	150	1,42 ± 0,31 <sup>B</sup>
	8	1,46 ± 0,37 <sup>A</sup>	250	1,83 ± 0,46 <sup>B</sup>
	12	2,21 ± 0,63 <sup>B</sup>	500	2,30 ± 0,40 <sup>C</sup>
	16	1,93 ± 0,55 <sup>B</sup>	1000	2,34 ± 0,39 <sup>C</sup>

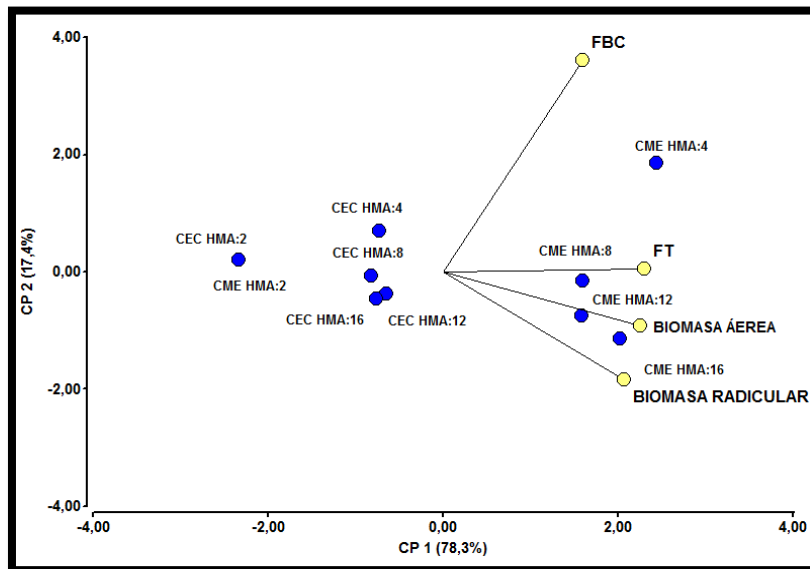
Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ ); ± desviación estándar; \* controles; BST= Biomasa Seca Total.

En lo que concierne a la absorción de Na en las especies evaluadas se observó que a nivel radicular CEC absorbió 2750 ppm de Na en la concentración alta (16 dS m<sup>-1</sup>); mientras que, CME absorbió 4763 ppm de Na (Figura 13 y tabla 16). Además, se observó que CME acumuló más cantidad de Na en biomasa aérea comparado con la especie CEC. Resultados similares se han observado en plantas comerciales inoculadas con HMA y crecidas en presencia de Na (Rouphael et al., 2015; Köhl et al., 2016; Schneider et al., 2016).

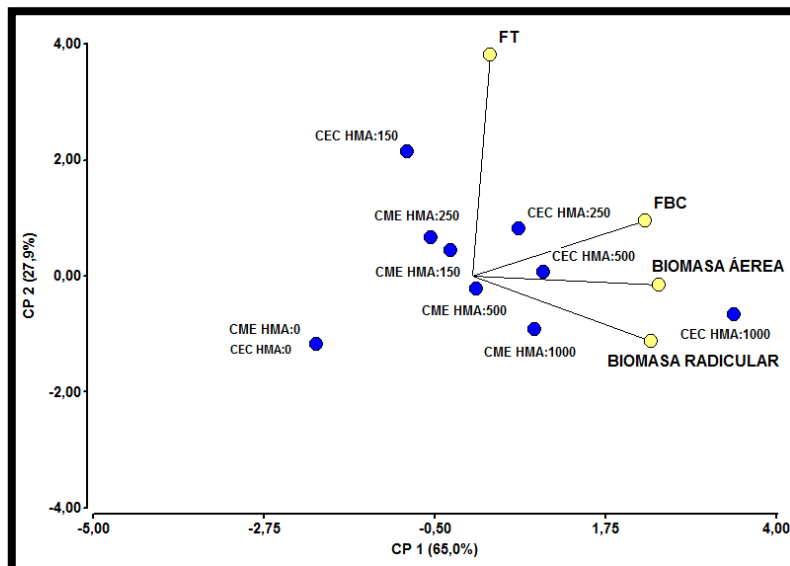
En lo que corresponde a la absorción de Pb en las especies evaluadas se observó que este elemento se acumula en mayor concentración a nivel radicular, siendo menor en la parte aérea como se puede observar en la figura 14 y tabla 16. Así observamos que CEC y CME absorbieron 4755.3 y 3098 ppm de Pb respectivamente en tejido radicular, resultados superiores e inferiores han sido reportado en biomasa radicular en las especies de *Vetiveria zizanioides*, *Pteris vitata*, *Pteridim aquilinun* y *Ricinus communis* alcanzando valores de 15433, 9343, 1433, 1106 ppm de Pb respectivamente. Se ha reportado que las estructuras fúngicas de los HMA tienen un rol importante en la retención de los elementos tóxicos estudiados en la biomasa radicular (González et al., 2005; Martínez et al., 2009; Sekara et al., 2005; Aka-Kacar et al., 2010; Moreira et al., 2011; Schneider et al., 2016).

La baja concentración de Pb en biomasa aérea observada en CEC y CME se debe a la retención de estos elementos en la biomasa radicular por la presencia de los HMA. Malekzadeh et al. (2016) sostienen que el Pb total del suelo es secuestrado por la glomalina disminuyendo de este modo los niveles de Pb en

la parte aérea de las plantas siendo esto considerado como una bioestabilización del elemento. En lo que corresponde a los factores de FBC y FT observamos que el Na se bioconcentra y trasloca con facilidad en ambas especies; mientras que, el Pb absorbido en CEC fue bioconcentrado y traslocado en mayor medida a diferencia de la especie CME. Las diferencias estadísticas significativas encontradas en estos análisis se detallan en la tabla 16.



**Figura 13.** Análisis de componentes principales usando cuatro variables para determinar la acumulación de Na en la biomasa (aérea y radicular) de (CME) y alamama (CEC) inoculadas con HMA evaluadas durante siete semanas.



**Figura 14.** Análisis de componentes principales usando cuatro variables para determinar la acumulación de Pb en la biomasa (aérea y radicular) de (CME) y alamama (CEC) inoculadas con HMA evaluadas durante siete semanas.

En lo que respecta a los resultados de Na y Pb en plantas no micorrizadas y micorrizadas de CEC y CME, observamos que se logró una reducción en la absorción de estos elementos destacando a CME con una reducción de 52 % en biomasa aérea para el contenido de Na; mientras que los porcentajes de Pb en biomasa aérea en las plantas de CEC obtuvo una reducción 20 % tal como se observa en la tabla 6. Estos resultados para el elemento Na son congruentes a lo observado por Montes-Rentería et al. (2011) quienes indican que aumenta la concentración de Na en biomasa aérea superior al 70 % a partir de 750 ppm (16 dS m<sup>-1</sup>) en plantas no micorrizadas, con respecto a las plantas micorrizadas los resultados concuerdan con lo reportado por Elhindi et al. (2017) quienes indican que a partir de 10 dS m<sup>-1</sup> las plantas mejoran su biomasa en un 50 % usando HMA. Los resultados correspondientes a Pb en ambas especies destacamos que los HMA contribuyen a la inmovilización de Pb presente en el suelo reteniendo dentro de su biomasa radicular y estructuras fúngicas (Huang et al., 1996; Schneider et al., 2012; Schneider et al., 2016; Hatami et al., 2018).

**Tabla 6. Porcentaje de retención micorrícica en CEC y CME.**

Elemento	Especie	Biomasa aérea (ppm)		% Retención
		Sin HMA	Con HMA	
Na	CEC	7416	669	9
	CME	7441	3917	52*
Pb	CEC	545	110	20*
	CME	328	35	10

\* Mayor retención de Na y Pb utilizando HMA.

## CAPÍTULO 4

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 CONCLUSIONES

- Las Cucurbitáceas tolerantes a las concentraciones estudiadas de Na ( $16 \text{ dS m}^{-1}$ ) y Pb (1000 ppm) fueron alamama (*Cucurbita ecuadoriensis*) y zapallo (*Cucurbita moschata*); mientras que, las especies susceptibles fueron melón (*Cucumis melo*) y sandía (*Citrullus lanatus*).
- Las plantas de melón acumulan Na en biomasa aérea y radicular mientras que alamama acumula Pb en biomasa aérea y sandía en mayor concentración en biomasa radicular.
- El consorcio de micorrizas arbusculares brindaron mayor tolerancia en Na y Pb (superior al 50 %) reteniendo estos elementos dentro de la biomasa radicular en alamama y melón.
- La especie silvestre alamama tiene mucho potencial en la agricultura y en procesos de biorremediación porque presenta mayor tolerancia al Na y Pb.

#### 4.2 RECOMENDACIONES

- Realizar expresión génica en plantas de Cucurbitáceas micorrizadas y desarrolladas en sustratos con altas concentraciones de Na y Pb.
- Evaluar el consorcio de HMA en plantas injertadas de Cucurbitáceas cultivadas en altas concentraciones de Na y Pb.
- Estudiar la interacción combinada de Na y Pb sobre las especies estudiadas.
- Identificar los mecanismos moleculares de alamama (*Cucurbita ecuadoriensis*) por medio del cual alcanza altos niveles de tolerancia a Na y Pb.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguirre, W., Fischer, G., & Miranda, D. (2012). Tolerancia a metales pesados a través del uso de micorrizas arbusculares en plantas cultivadas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(1), 141-154.
2. Aka-Kacar, Y. I. L. D. I. Z., Akpınar, C., Agar, A., Yalcin-Mendi, Y. E. Ş. İ. M., Serce, S., & Ortas, I. (2010). The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during acclimatization. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(3), 5246-5252.
3. Alam, M., Juraimi, A. S., Rafii, M. Y., & Abdul Hamid, A. (2015). Effect of salinity on biomass yield and physiological and stem-root anatomical characteristics of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions. *BioMed research international*.
4. Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
5. Andrango, C., Cueva, M., Viera, W., & Duchicela, J. (2016). Evaluation of methods to estimate mycorrhizal inoculums potential in field soils, ESPE, Sangolquí - Ecuador.
6. Bago, B., Pfeffer, P. E., Abubaker, J., Jun, J., Allen, J. W., Brouillette, J., ... & Shachar-Hill, Y. (2003). Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant physiology*, 131(3), 1496-1507.
7. Barraza, F. V. (2012). Acumulación de materia seca del cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) en invernadero. *Temas agrarios*, 17(2), 18-29.
8. Bothe, H., Turnau, K., & Regvar, M. (2010). The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in protecting endangered plants and habitats. *Mycorrhiza*, 20(7), 445-457.
9. Callejas, R., Kania, E., Contreras, A., Peppi, C., & Morales, L. (2013). Evaluación de un método no destructivo para estimar las concentraciones de clorofila en hojas de variedades de uva de mesa. *Idesia (Arica)*, 31(4), 19-26.
10. Camenzind, T., Homeier, J., Dietrich, K., Hempel, S., Hertel, D., Krohn, A., ... & Rillig, M. C. (2016). Opposing effects of nitrogen versus phosphorus additions on mycorrhizal fungal abundance along an elevational gradient in tropical montane forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 94, 37-47.
11. Casares Acosta, M. Á. (2015). La presión demográfica rural en los espacios agropecuarios y sus impactos en el recurso suelo del Ecuador continental. Línea de investigación: uso sustentable del espacio. Ordenamiento territorial. Ocupación del territorio y poblamiento. Problemas globales del uso y aprovechamiento de los recursos naturales. Dinámicas demográficas y asentamientos humanos (Bachelor's thesis, PUCE).
12. Cerda, A., Pardines, J., Botella, M. A., & Martínez, V. (1995). Effect of potassium on growth, water relations, and the inorganic and organic solute contents for two maize cultivars grown under saline conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 18(4), 839-851.



13. Chandrasekaran, M., Kim, K., Krishnamoorthy, R., Walitang, D., Sundaram, S., Joe, M. M., ... & Sa, T. (2016). Mycorrhizal symbiotic efficiency on C3 and C4 plants under salinity stress—A meta-analysis. *Frontiers in microbiology*, 7, 1246.
14. Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Thilagar, G., & Ravi, J. E. (2012). Plant growth response of French bean to arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Soil Biology and Ecology*, 32(1-2), 50-56.
15. Chen, J., Zhang, H., Zhang, X., & Tang, M. (2017). Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Alleviates Salt Stress in Black Locust through Improved Photosynthesis, Water Status, and K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> Homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1739.
16. Chico, J., De Chico, L., Rodríguez, M., & Guerrero, M. (2012). Capacidad remediadora de la raíz de girasol, *Helianthus annuus*, cuando es sometida a diferentes concentraciones de plomo. *REBIOL. Trujillo, Perú*, 32(2), 13-19.
17. Cicatelli, A., Lingua, G., Todeschini, V., Biondi, S., Torrigiani, P., & Castiglione, S. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi restore normal growth in a white poplar clone grown on heavy metal-contaminated soil, and this is associated with upregulation of foliar metallothionein and polyamine biosynthetic gene expression. *Annals of botany*, 106(5), 791-802.
18. De la Noval, B., Fernández, M. I., & Fernández, J. C. (1995). Efecto del uso de la micorriza arbuscular y combinaciones de sustrato sobre el crecimiento y desarrollo de vitroplantas de piña. *Cultivos Tropicales*, 16(1), 19-22.
19. Elhindi, K. M., El-Din, A. S., & Elgorban, A. M. (2017). The impact of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating salt-induced adverse effects in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Saudi journal of biological sciences*, 24(1), 170-179.
20. Estrada, B., Aroca, R., Maathuis, F. J., Barea, J. M., & Ruiz-Lozano (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi native from a Mediterranean saline area enhance maize tolerance to salinity through improved ion homeostasis. *Plant, cell & environment*, 36(10), 1771-1782.
21. Frosi, G., Barros, V. A., Oliveira, M. T., Santos, M., Ramos, D. G., Maia, L. C., & Santos, M. G. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and foliar phosphorus inorganic supply alleviate salt stress effects in physiological attributes, but only arbuscular mycorrhizal fungi increase biomass in woody species of a semiarid environment. *Tree physiology*, 38(1), 25-36.
22. Galindo Pardo, F. V., Fortis Hernández, M., Preciado Rangel, P., Trejo Valencia, R., Segura Castruita, M. Á., & Orozco Vidal, J. A. (2014). Caracterización físico-química de sustratos orgánicos para producción de pepino (*Cucumis sativus* L.) bajo sistema protegido. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(7), 1219-1232.
23. Giri, B., Kapoor, R., & Mukerji, K. G. (2007). Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbial ecology*, 54(4), 753-760.

24. González Guamán, C. E. (2016). Evaluación de la concentración mínima aceptable e identificación de metales pesados presentes en el grano de Cacao del Ecuador, Machala - Ecuador.
25. González Guerrero, M. (2005). Estudio de los mecanismos implicados en la homeostasis de metales pesados en el hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus intraradices*.
26. Grattan, S. R., & Hanson, B. R. (2006). Crop salt tolerance. Agricultural salinity and drainage. Univ. of California Irrigation Program, Davis. [http://hos.ufl.edu/sites/default/files/faculty/gdliu/HansonGrattan2006\\_0.pdf](http://hos.ufl.edu/sites/default/files/faculty/gdliu/HansonGrattan2006_0.pdf) (accessed 23 Nov. 2013), 15-22.
27. Guerrero, N. R., Quintero, M. A. O., & Naranjo, J. C. P. (2012). Determinación del área foliar en fotografías tomadas con una cámara web, un teléfono celular o una cámara semiprofesional. Revista Facultad Nacional de Agronomía, 65(1), 6399-6405.
28. Guzmán, G. (2013). Efecto del plomo sobre la imbibición, germinación y crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. y *Zea mays* L. Biotecnología Vegetal, 13(3).
29. Hanson, B., Grattan, S. R., & Fulton, A. (1999). Agricultural salinity and drainage. Davis: University of California Irrigation Program, University of California.
30. Harris-Valle, C., Esqueda, M., Gutiérrez, A., Castellanos, A. E., Gardea, A. A., & Berbara, R. (2017). Physiological response of *Cucurbita pepo* var. pepo mycorrhized by Sonoran desert native arbuscular fungi to drought and salinity stresses. Brazilian Journal of Microbiology.
31. Hashem, A., Abd\_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Al-Huqail, A. A., & Shah, M. A. (2016). Induction of Osmoregulation and Modulation of Salt Stress in *Acacia gerrardii* Benth. by Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Bacillus subtilis* (BERA 71). BioMed research international, 2016.
32. Hatami E., Abbaspour A., Dorostkar V. (2018). Phytoremediation of a petroleum-polluted soil by native plant species in Lorestan Province, Iran. Environ Sci Pollut Res Int. Jan 22. doi: 10.1007/s11356-018-1297-7.
33. Huang, J. W., & Cunningham, S. D. (1996). Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. New phytologist, 134(1), 75-84.
34. Hussein, M., Embiale, A., Husen, A., Aref, I. M., & Iqbal, M. (2017). Salinity-induced modulation of plant growth and photosynthetic parameters in faba bean (*Vicia faba*) cultivars. Pak. J. Bot, 49(3), 867-877.
35. Kamel, L., Keller- Pearson, M., Roux, C., & Ané, J. M. (2017). Biology and evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the light of genomics. New Phytologist, 213(2), 531-536.
36. Kaur, G., Singh, H. P., Batish, D. R., & Kumar, R. K. (2012). Growth, photosynthetic activity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) after exposure of lead to soil. Journal of environmental biology, 33(2), 265.
37. Khaleghi, E., Arzani, K., Moallemi, N., & Barzegar, M. (2012). Evaluation of chlorophyll content and chlorophyll fluorescence parameters and relationships between chlorophyll a, b and chlorophyll content index under water stress in *Olea europaea* cv. Dezful. World Acad. Sci. Eng. Technol, 68, 1154-1157.

38. Kobae Y., Kameoka H., Sugimura Y., Saito K., Ohtomo R., Fujiwara T., Kyojuka J. (2018). Strigolactone biosynthesis genes of rice is required for the punctual entry of arbuscular mycorrhizal fungi into the roots. *Plant Cell Physiol.* Jan 9. doi: 10.1093/pcp/pcy001.
39. Köhl, L., & van der Heijden, M. G. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal species differ in their effect on nutrient leaching. *Soil Biology and Biochemistry*, 94, 191-199.
40. Lebeau, T., Braud, A., & Jézéquel, K. (2008). Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environmental Pollution*, 153(3), 497-522.
41. Lermen, C., Mohr, F. B. M., & Alberton, O. (2015). Growth of *Cymbopogon citratus* inoculated with mycorrhizal fungi under different levels of lead. *Scientia Horticulturae*, 186, 239-246.
42. Luna, J. R., Di Bernardo, M. L., Valdivieso, A., Quintero, T. H. M., & Ovalles, J. (2010). Digestión de productos fitoterapéuticos, asistido por microondas, para el análisis espectrofotométrico de Plomo. *Revista de Toxicología en línea*, 32, 20-32.
43. Maldonado-Magaña, A., Favela-Torres, E., Rivera-Cabrera, F., & Volke-Sepulveda, T. L. (2011). Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant and soil*, 339(1-2), 377-389.
44. Malekzadeh, E., Aliasghar zad, N., Majidi, J., Abdolalizadeh, J., & Aghebati-Maleki, L. (2016). Contribution of glomalin to Pb sequestration by arbuscular mycorrhizal fungus in a sand culture system with clover plant. *European Journal of Soil Biology*, 74, 45-51.
45. Malkowski, E., Kurtyka, R., Kita, A., & Karcz, W. (2005). Accumulation of Pb and Cd and its effect on Ca distribution in maize seedlings (*Zea mays* L.). *Pol. J. Environ. Stud.*, 14(2), 203.
46. Manousaki, E., & Kalogerakis, N. (2009). Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): metal uptake in relation to salinity. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(7), 844-854.
47. Martí L., Burba J., Cavagnaro M. (2002). Metales pesados en fertilizantes fosfatados, nitrogenados y mixtos. *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XXXIV. N° 2. Departamento de Ingeniería Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo. Alte. Brown N° 500. Casilla de Correo 7. M5528AHB Chacras de Coria. Mendoza. Argentina.
48. Martínez, L. B., & Pugnaire, F. I. (2009). Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Revista Ecosistemas*, 18(2).
49. McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist*, 115(3), 495-501.
50. Menzel, A., Hempel, S., Manceur, A. M., Götzenberger, L., Moora, M., Rillig, M. C., ...& Kühn, I. (2016). Distribution patterns of arbuscular mycorrhizal

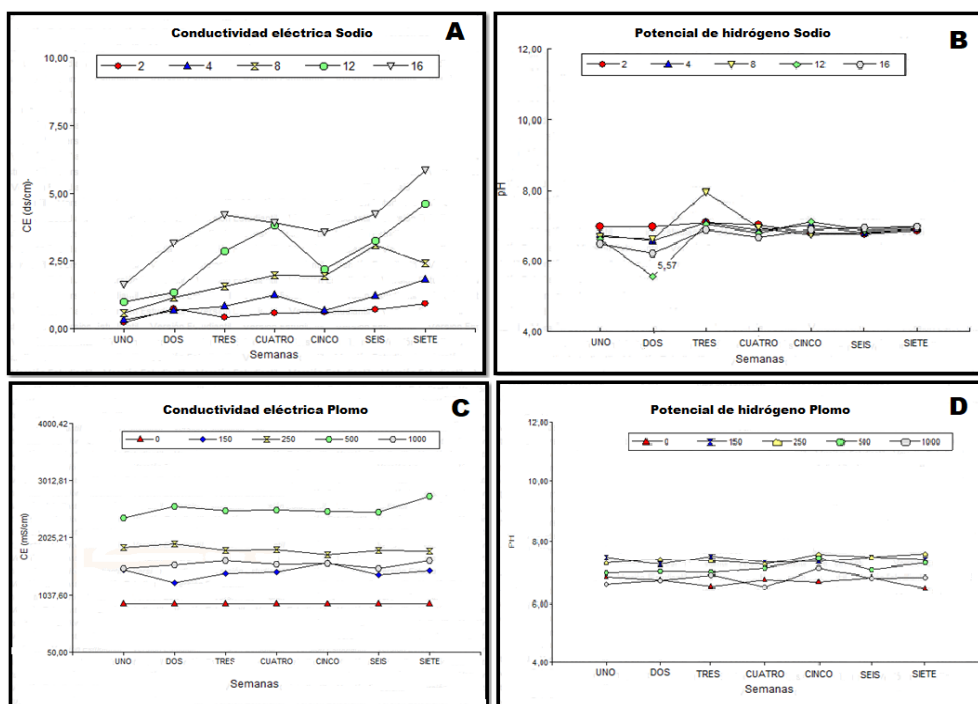
- and non-mycorrhizal plant species in Germany. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 21, 78-88.
51. Miranda, D., Ulrichs, C., & Fischer, G. (2012). Efecto del cloruro de sodio (NaCl) sobre el crecimiento y colonización micorrízica en uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Avances de la investigación agronómica II*. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, 15-25.
  52. Mnasri, M., Janoušková, M., Rydlová, J., Abdelly, C., & Ghnaya, T. (2017). Comparison of arbuscular mycorrhizal fungal effects on the heavy metal uptake of a host and a non-host plant species in contact with extraradical mycelial network. *Chemosphere*, 171, 476-484.
  53. Moína-Quimí E., Oviedo-Anchundia R., Nieto-Barcelona S., Herrera-Samaniego P., Barcos-Arias M. (2018). Evaluación de los Hongos Micorrízicos Arbusculares de zonas del trópico húmedo del Ecuador, *Bionatura*, <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2018>.
  54. Montes-Rentería, G. D., Arreola-Ávila, J. G., Trejo-Calzada, R., & Rodríguez-López, J. S. (2011). Acumulación de iones en nogal pecanero [*Carya illinoensis* (wangenh) k. koch] de maduración temprana, sometidos a diferentes condiciones de salinidad. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 10(2).
  55. Moreira, H., Marques, A. P., Rangel, A. O., & Castro, P. M. (2011). Heavy metal accumulation in plant species indigenous to a contaminated Portuguese site: prospects for phytoremediation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 221(1-4), 377.
  56. Naranjo J., Chica E. (2014). Evaluación de la tolerancia a la salinidad de cucurbitáceas silvestres del Ecuador y sus potenciales usos como patrones en injertos de cucurbitáceas comerciales. Trabajo final para la obtención del título: Ingeniero Agrícola y Biológico Espol.Fimcp, Guayaquil. 63
  57. Neuenkamp L., Moora M., Öpik M., Davison J., Gerz M., Männistö M., Jairus T., Vasar M., Zobel M. (2018). The role of plant mycorrhizal type and status in modulating the relationship between plant and arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol.* Jan 25. doi: 10.1111/nph.14995.
  58. Niu, Z. X., Sun, L. N., Sun, T. H., Li, Y. S., & Hong, W. A. N. G. (2007). Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of environmental sciences*, 19(8), 961-967.
  59. Ortas, İ., Rafique, M., Akpınar, C., & Kacar, Y. A. (2017). Growth media and mycorrhizal species effect on acclimatization and nutrient uptake of banana plantlets. *Scientia Horticulturae*, 217, 55-60.
  60. Osorio, C. E. U., Sánchez, D. A. C., & Molano, A. E. F. (2008). Multiplicación de hongos micorriza arbuscular (HMA) y efecto de la micorrización en plantas micropropagadas de banano (*Musa* AAA cv. Gran Enano)(Musaceae). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 61(1), 4279.
  61. Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775.

62. Peng, J., Zhang, L., Liu, J., Luo, J., Zhao, X., Dong, H., ... & Meng, Y. (2016). Effects of Soil Salinity on Sucrose Metabolism in Cotton Fiber. *PloS one*, 11(5), e0156398.
63. Porcel, R., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Aroca, R., Garcia, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress. *Journal of plant physiology*, 185, 75-83.
64. Pozo, W., Santafeliu, T., & Carrera, G. (2011). Metales pesados en humedades de arroz en la Cuenca baja del Río Guayas.
65. Proaño, J., Suarez, C., & Briones, C. (2011). Estudio de metodologías para la validación de un modelo predictivo para el manejo y control de la salinidad del suelo y del agua en la península de Santa Elena. Universidad Agraria, Guayaquil-Ecuador.
66. Reyes, I. (2016). Renovación de cuatro cepas de micorriza vesículo arbuscular en cultivo de perejil (*Petroselinum crispum*) y pasto marandú (*Brachiaria brizantha*) en macrotúnel, Zamorano, Honduras.
67. Ribeiro, D. S. S., Adrián, L. D. A. S., Anjos, D. S. L., & Schiavinato, M. A. (2012). Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. *Journal of environmental management*, 110, 299-307.
68. Roupshael, Y., Franken, P., Schneider, C., Schwarz, D., Giovannetti, M., Agnolucci, M., ... & Colla, G. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 196, 91-108.
69. Salmerón Canales, N. E., & Medina Caballero, W. R. (2009). Estudio preliminar del efecto de diferentes dosis y momentos de aplicación de micorrizas vesículo arbusculares (MVA), sobre el desarrollo fenológico en el cultivo de sandía (*Citrullus lanatus*) y densidades poblacionales de nematodos de suelo en el Campo Agropecuario de la UNAN-León, durante el ciclo agrícola 2008 (Doctoral dissertation).
70. Scharnagl, K., Sanchez, V., & Wettberg, E. (2018). The impact of salinity on mycorrhizal colonization of a rare legume, *Galactia smallii*, in South Florida pine rocklands. *BMC research notes*, 11(1), 2.
71. Schneider, J., Bundschuh, J., & do Nascimento, C. W. A. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation of a lead-contaminated site. *Science of The Total Environment*, 572, 86-97.
72. Schneider, J., Oliveira, L. M., Guilherme, L. R. G., Stürmer, S. L., & Soares, C. R. F. S. (2012). Espécies tropicais de pteridófitas em associação com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com arsênio. *Quim. Nova*, 35(4), 709-714.
73. Sekara, A., Poniedzialek, M., Ciura, J., & Jedrszczyk, E. (2005). Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(4), 509-516.

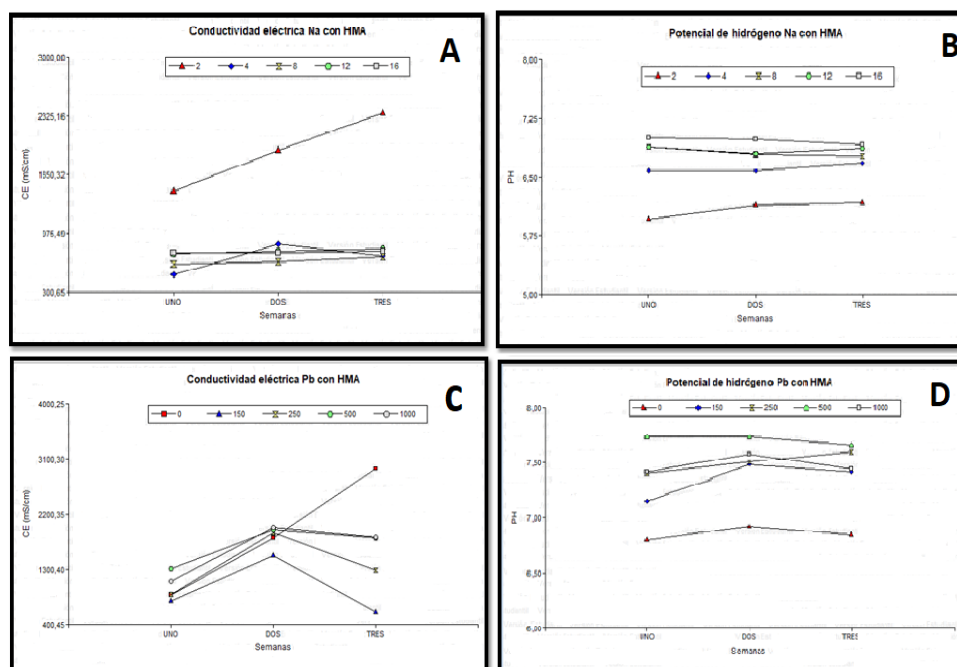
74. Selvakumar, G., Krishnamoorthy, R., Kim, K., & Sa, T. (2016). Propagation technique of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from coastal reclamation land. *European Journal of Soil Biology*, 74, 39-44.
75. Sengar, R. S., Gautam, M., Garg, S. K., Chaudhary, R., & Sengar, K. (2008). Effect of lead on seed germination, seedling growth, chlorophyll content and nitrate reductase activity in mung bean (*Vigna radiata*). *J. Phytochem*, 2(2), 61-68.
76. Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian journal of plant physiology*, 17(1), 35-52.
77. Shu, S., Yuan, Y., Chen, J., Sun, J., Zhang, W., Tang, Y., ... & Guo, S. (2015). The role of putrescine in the regulation of proteins and fatty acids of thylakoid membranes under salt stress. *Scientific reports*, 5, 14390.
78. Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Bhardwaj, R., Singh, H. P., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2018). Bioaccumulation and physiological responses to lead (Pb) in *Chenopodium murale* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 151, 83-90.
79. Singh, N. V., Singh, S. K., Singh, A. K., Meshram, D. T., Suroshe, S. S., & Mishra, D. C. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced hardening of micropropagated pomegranate (*Punica granatum* L.) plantlets. *Scientia horticulturae*, 136, 122-127.
80. Tintin Verdezoto, F. A., & Moscoso Fernández-Salvador, P. F. (2013). Capacidad de absorción de la planta de papa (*Solanum tuberosum*), en el suelo contaminado con plomo (Bachelor's thesis), Cuenca - Ecuador.
81. Tovar-Franco, J. (2006). Selección en invernadero de inóculos de micorriza arbuscular (MA) para el establecimiento de la alfalfa en un Andisol de la Sabana de Bogotá. *Universitas Scientiarum*, 11(Esp).
82. Vaca Gómez, J. V., & Zuleta Ospina, J. (2016). Evaluación del contenido de materia seca y nutrientes en cada etapa de desarrollo de lulo híbrido la selva, clon P 32 (*Solanum quitoense* Lam x *Solanum birtum*) en el municipio Santa Rosa de Cabal, Risaralda (Doctoral dissertation).
83. Van Aarle, I. M., Cavagnaro, T. R., Smith, S. E., Smith, F. A., & Dickson, S. (2005). Metabolic activity of *Glomus intraradices* in Arum- and Paris- type arbuscular mycorrhizal colonization. *New Phytologist*, 166(2), 611-618.
84. Vicente-Sánchez, J., Nicolás, E., Pedrero, F., Alarcón, J. J., Maestre-Valero, J. F., & Fernández, F. (2014). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates detrimental effects of saline reclaimed water in lettuce plants. *Mycorrhiza*, 24(5), 339-348.
85. Villa Castorena, M., Catalán Valencia, E. A., Inzunza Ibarra, M. A., & Ulery, A. L. (2006). Absorción y traslocación de sodio y cloro en plantas de Chile fertilizadas con nitrógeno y crecidas con estrés salino. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(1).
86. Wang C., Chen Q., Xiang N., Liu Y., Kong X., Yang Y., Hu X. (2018). SIP1, a novel SOS2 interaction protein, is involved in salt-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem.* 124:167-174. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.01.018.

87. Wang, L., Li, Q., Lei, Q., Feng, C., Gao, Y., Zheng, X., ... & Kong, J. (2015). MzPIP2; 1: an aquaporin involved in radial water movement in both water uptake and transportation, altered the drought and salt tolerance of transgenic *Arabidopsis*. PLoS One, 10(11), e0142446.
88. Ważny R., Rozpądek P., Jędrzejczyk R.J., Śliwa M., Stojakowska A., Anielska T., Turnau K. (2018). Does co-inoculation of *Lactuca serriola* with endophytic and arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth in a polluted environment. Mycorrhiza. Jan 23. doi: 10.1007/s00572-018-0819-y.
89. Xu, H., Su, W., Zhang, D., Sun, L., Wang, H., Xue, F., ... & Wu, R. (2017). Influence of environmental factors on *Cucumis melo* L. var. *agrestis* Naud. seed germination and seedling emergence. PloS one, 12(6), e0178638.
90. Yadav, K., Aggarwal, A., & Singh, N. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi induced acclimatization and growth enhancement of *Glycyrrhiza glabra* L.: a potential medicinal plant. Agricultural Research, 2(1), 43-47.
91. Yang, Y., Han, X., Liang, Y., Ghosh, A., Chen, J., & Tang, M. (2015). The combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters, photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. PloS one, 10(12), e0145726.
92. Yang, Y., Liang, Y., Han, X., Chiu, T.-Y., Ghosh, A., Chen, H., & Tang, M. (2016). The roles of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation and tree-herb interactions in Pb contaminated soil. Scientific Reports, 6, 20469. <http://doi.org/10.1038/srep20469>.
93. Yang, Z., Chang, Z., Sun, L., Yu, J., & Huang, B. (2014). Physiological and metabolic effects of 5-aminolevulinic acid for mitigating salinity stress in creeping bentgrass. PloS one, 9(12), e116283.
94. Zhang Q., Gao X., Ren Y., Ding X., Qiu J., Li N., Zeng F., Chu Z. (2018). Improvement of *Verticillium* Wilt Resistance by Applying Arbuscular Mycorrhizal Fungi to a Cotton Variety with High Symbiotic Efficiency under Field Conditions. Int J Mol Sci. Jan 13;19(1). pii: E241. doi: 10.3390/ijms19010241.
95. Zhang, H. J., Zhang, N., Yang, R. C., Wang, L., Sun, Q. Q., Li, D. B., ... & Guo, Y. D. (2014). Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Journal of pineal research, 57(3), 269-279.
96. Zubek, S., Stefanowicz, A. M., Błaszowski, J., Niklińska, M., & Seidler-Łożykowska, K. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi and soil microbial communities under contrasting fertilization of three medicinal plants. Applied soil ecology, 59, 106-115.

## ANEXOS DE FIGURAS

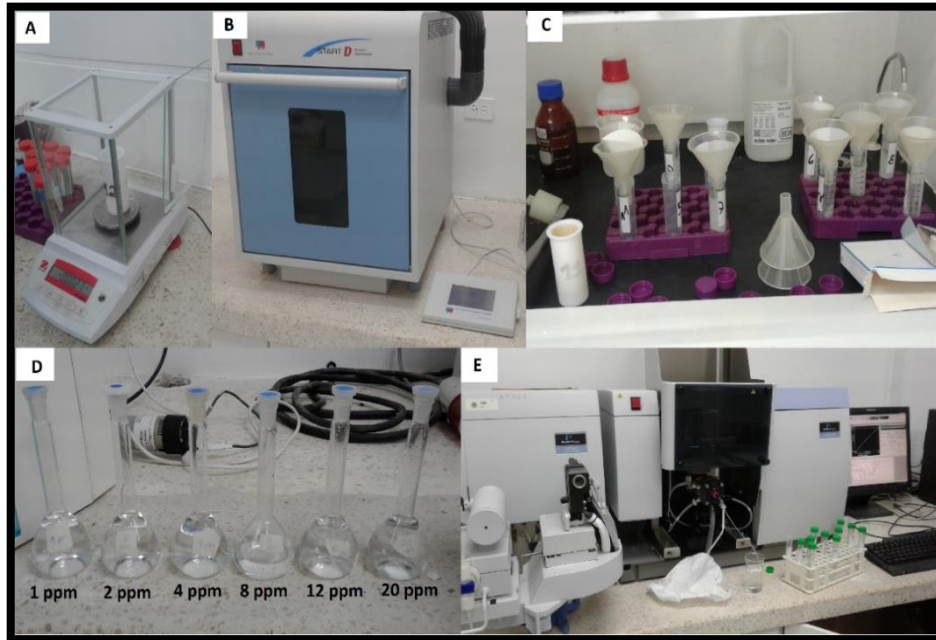


**Figura 15.** Conductividad eléctrica (CE) y potencial de hidrógeno (pH) desarrollado en el sustrato utilizado en tamo y arena hasta la séptima semana de evaluación; A-B) CE y pH del sustrato contaminado por Na; C-D) CE y pH del sustrato contaminado por Pb.

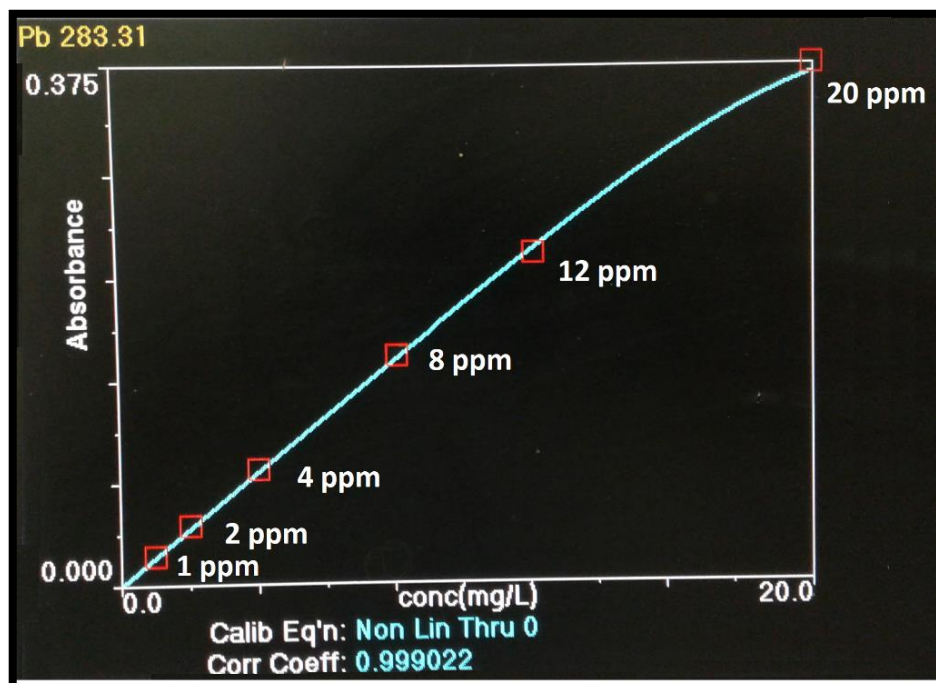


**Figura 16.** Conductividad eléctrica y potencial de hidrógeno desarrollado en el sustrato utilizado en tamo y arena hasta la séptima semana de evaluación en tres muestreos utilizando HMA; A-B) CE y pH del sustrato contaminado por Na; C-D) CE y pH del sustrato contaminado por Pb.

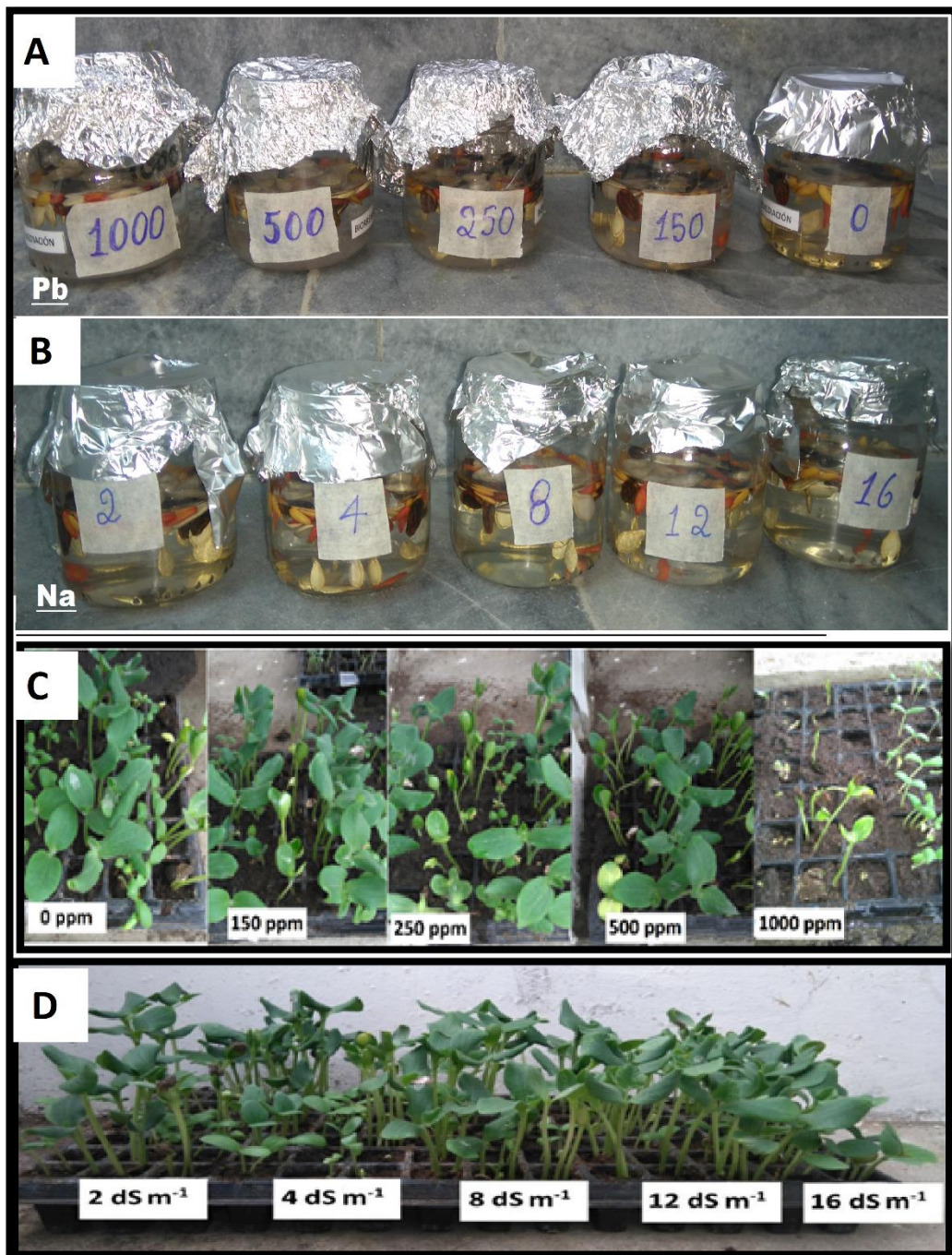




**Figura 17.** Digestión y lectura de Pb por espectroscopia de absorción atómica; A) Pesado de muestras, B) Digestor de microondas, C) Filtrado de muestras digeridas, D) Control de calidad estandar, E) Lectura de muestras en espectro.



**Figura 18.** Curva de calibración del espectrofotómetro de absorción atómica para el análisis de Pb en biomasa de Cucurbitáceas.



**Figura 19.** Experimento de imbibición de semillas en nitrato de plomo (A) cloruro de sodio (B) y sobre CEC, CLA, CME y CMO germinadas en Na y Pb (C y D).

## ANEXOS DE TABLAS

Tabla 7. Solución hidropónica modificada de Steiner.

	Nutrientes	Para 4 L H <sub>2</sub> O (10x)	Para 100 L H <sub>2</sub> O	Fórmula Química
<b>Macro</b>	Nitrato de Calcio	39,5672	98,918	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
	Sulfato de Magnesio (Sal de Epsom)	19,7976	49,494	Mg SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.
	Nitrato de Potasio	3,6504	9,126	KNO <sub>3</sub>
	Dihidrógeno Fosfato de Potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5,4432	13,608	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	Sulfato de Potasio	18,0528	45,132	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Micro</b>	<b>Quelato de hierro (EDTA) ml</b>	12	3	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> N <sub>3</sub> NaFe
	<b>Sulfato de Manganeso</b>	0,76	0,19	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
	<b>Ácido Bórico en polvo</b>	1,004	0,251	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	<b>Sulfato de zinc</b>	0,12	0,03	ZnSO <sub>4</sub>
	<b>Sulfato de cobre</b>	0,028	0,007	Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	<b>Molibdato de Sodio</b>	0,0048	0,0012	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>

Los valores esta calculados en gramos de reactivo.

Tabla 8. Germinación de Cucurbitáceas en la imbibición con Pb.

Especies	Tratamientos con Pb	Porcentaje de germinación	Vigor	Índice de la tasa de emergencia
CME	0 ppm	100	0,00120	0,000012
CME	150 ppm	100	0,00120	0,000012
CME	250 ppm	100	0,00120	0,000012
CME	500 ppm	100	0,00120	0,000012
CME	1000 ppm	100	0,00120	0,000012
CEC	0 ppm	46	0,00567	0,000123284
CEC	150 ppm	53	0,00427	8,06035E-05
CEC	250 ppm	20	0,03000	0,0015
CEC	500 ppm	26	0,01775	0,000682749
CEC	1000 ppm	13	0,07101	0,005461994
CLA	0 ppm	86	0,00162	1,88663E-05
CLA	150 ppm	100	0,00120	0,000012
CLA	250 ppm	100	0,00120	0,000012
CLA	500 ppm	100	0,00120	0,000012
CLA	1000 ppm	86	0,00162	1,88663E-05
CMO	0 ppm	100	0,00120	0,000012
CMO	150 ppm	100	0,00120	0,000012
CMO	250 ppm	100	0,00120	0,000012
CMO	500 ppm	100	0,00120	0,000012
CMO	1000 ppm	6	0,02000	0,003333333

Porcentaje de germinación evaluado a los 12 días después de la imbibición en Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

**Tabla 9. Germinación de Cucurbitáceas en la imbibición con Na.**

<b>Especies</b>	<b>Tratamientos con Na</b>	<b>Porcentaje de germinación</b>	<b>Vigor</b>	<b>Índice de la tasa de emergencia</b>
CME	2 dS m <sup>-1</sup>	100	0,00120	0,000012
CME	4 dS m <sup>-1</sup>	100	0,00120	0,000012
CME	8 dS m <sup>-1</sup>	93	0,00116	1,24323E-05
CME	12 dS m <sup>-1</sup>	93	0,00116	1,24323E-05
CME	16 dS m <sup>-1</sup>	86	0,00135	1,57219E-05
CEC	2 dS m <sup>-1</sup>	40	0,00484	0,000120968
CEC	4 dS m <sup>-1</sup>	53	0,00365	6,8903E-05
CEC	8 dS m <sup>-1</sup>	66	0,00293	4,44326E-05
CEC	12 dS m <sup>-1</sup>	73	0,00265	3,63198E-05
CEC	16 dS m <sup>-1</sup>	73	0,00265	3,63198E-05
CLA	2 dS m <sup>-1</sup>	73	0,00265	3,63198E-05
CLA	4 dS m <sup>-1</sup>	73	0,00265	3,63198E-05
CLA	8 dS m <sup>-1</sup>	73	0,00265	3,63198E-05
CLA	12 dS m <sup>-1</sup>	73	0,00265	3,63198E-05
CLA	16 dS m <sup>-1</sup>	73	0,00265	3,63198E-05
CMO	2 dS m <sup>-1</sup>	100	0,00120	0,000012
CMO	4 dS m <sup>-1</sup>	100	0,00120	0,000012
CMO	8 dS m <sup>-1</sup>	100	0,00120	0,000012
CMO	12 dS m <sup>-1</sup>	100	0,00120	0,000012
CMO	16 dS m <sup>-1</sup>	100	0,00120	0,000012

Porcentaje de germinación evaluado a los 12 días después de la imbibición en NaCl.

**Tabla 10. Parámetros agronómicos evaluados a la séptima semana sobre Cucurbitáceas tratadas con cloruro de sodio.**

Especies	Tratamientos (dS m <sup>-1</sup> )	Altura (cm)	Número de hojas	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
CEC	* 2	14 ± 4,2 <sup>B</sup>	8 ± 0,9 <sup>F</sup>	49 ± 11,1 <sup>C</sup>
	4	13 ± 3,3 <sup>B</sup>	8 ± 0,6 <sup>F</sup>	57 ± 7,8 <sup>C</sup>
	8	15 ± 3,1 <sup>B</sup>	8 ± 0,5 <sup>F</sup>	54 ± 5,4 <sup>C</sup>
	12	20 ± 7,4 <sup>D</sup>	9 ± 1,0 <sup>G</sup>	57 ± 4,0 <sup>C</sup>
	16	17 ± 3,9 <sup>C</sup>	8 ± 0,5 <sup>F</sup>	49 ± 6,2 <sup>C</sup>
CLA	* 2	41 ± 8,3 <sup>I</sup>	8 ± 1,1 <sup>F</sup>	22 ± 3,1 <sup>B</sup>
	4	45 ± 8,1 <sup>I</sup>	11 ± 1,2 <sup>G</sup>	17 ± 0,7 <sup>B</sup>
	8	37 ± 4,4 <sup>H</sup>	9 ± 1,7 <sup>G</sup>	12 ± 2,0 <sup>A</sup>
	12	32 ± 6,1 <sup>G</sup>	7 ± 0,8 <sup>F</sup>	11 ± 1,2 <sup>A</sup>
	16	29 ± 6,1 <sup>F</sup>	9 ± 0,6 <sup>F</sup>	8 ± 1,6 <sup>A</sup>
CME	* 2	50 ± 7,5 <sup>I</sup>	10 ± 0,9 <sup>G</sup>	30 ± 0,51 <sup>B</sup>
	4	38 ± 5,7 <sup>H</sup>	9 ± 0,5 <sup>G</sup>	21 ± 1,4 <sup>B</sup>
	8	32 ± 4,1 <sup>G</sup>	8 ± 0,5 <sup>F</sup>	14 ± 0,4 <sup>A</sup>
	12	27 ± 1,6 <sup>E</sup>	7 ± 1,0 <sup>E</sup>	12 ± 1,8 <sup>A</sup>
	16	21 ± 7,1 <sup>D</sup>	7 ± 0,5 <sup>D</sup>	10 ± 1,5 <sup>A</sup>
CMO	* 2	10 ± 1,1 <sup>A</sup>	6 ± 0,3 <sup>A</sup>	56 ± 11,3 <sup>C</sup>
	4	9 ± 0,7 <sup>A</sup>	6 ± 0,2 <sup>B</sup>	60 ± 3,8 <sup>C</sup>
	8	10 ± 0,9 <sup>A</sup>	6 ± 0,2 <sup>B</sup>	60 ± 1,6 <sup>C</sup>
	12	10 ± 0,9 <sup>A</sup>	7 ± 0,0 <sup>C</sup>	60 ± 3,7 <sup>C</sup>
	16	9 ± 1,2 <sup>A</sup>	7 ± 0,0 <sup>C</sup>	58 ± 2,7 <sup>C</sup>

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ ); ± desviación estándar; \* controles.

**Tabla 11. Parámetros agronómicos evaluados a la séptima semana sobre Cucurbitáceas tratadas con nitrato de plomo sin inoculación de HMA.**

Especies	Tratamientos (ppm)	Altura (cm)	Número de hojas	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
CEC	* 0	10 ± 2,0 <sup>A</sup>	10 ± 2,4 <sup>C</sup>	41 ± 1,8 <sup>D</sup>
	150	14 ± 3,1 <sup>B</sup>	8 ± 0,5 <sup>B</sup>	61 ± 11,3 <sup>E</sup>
	250	18 ± 3,4 <sup>C</sup>	8 ± 0,5 <sup>B</sup>	55 ± 6,0 <sup>E</sup>
	500	21 ± 6,3 <sup>D</sup>	8 ± 0,5 <sup>B</sup>	51 ± 3,1 <sup>E</sup>
	1000	17 ± 4,8 <sup>C</sup>	8 ± 0,9 <sup>B</sup>	39 ± 4,4 <sup>D</sup>
CLA	* 0	36 ± 6,2 <sup>H</sup>	9 ± 1,3 <sup>B</sup>	15 ± 2,7 <sup>B</sup>
	150	39 ± 6,6 <sup>H</sup>	9 ± 1,3 <sup>C</sup>	10 ± 0,2 <sup>A</sup>
	250	38 ± 6,6 <sup>H</sup>	8 ± 0,8 <sup>B</sup>	9 ± 0,6 <sup>A</sup>
	500	39 ± 13,3 <sup>H</sup>	9 ± 1,7 <sup>C</sup>	8 ± 0,7 <sup>A</sup>
	1000	25 ± 4,5 <sup>F</sup>	7 ± 1,1 <sup>A</sup>	7 ± 0,3 <sup>A</sup>
CME	* 0	46 ± 12,7 <sup>H</sup>	9 ± 1,8 <sup>C</sup>	26 ± 4,2 <sup>C</sup>
	150	35 ± 13,8 <sup>H</sup>	9 ± 2,1 <sup>B</sup>	20 ± 0,5 <sup>B</sup>
	250	33 ± 5,7 <sup>H</sup>	9 ± 0,9 <sup>B</sup>	17 ± 1,7 <sup>B</sup>
	500	29 ± 5,7 <sup>G</sup>	8 ± 0,8 <sup>B</sup>	14 ± 0,4 <sup>B</sup>
	1000	23 ± 5,2 <sup>E</sup>	7 ± 0,9 <sup>A</sup>	9 ± 0,2 <sup>A</sup>
CMO	* 0	11 ± 1,0 <sup>B</sup>	7 ± 0,0 <sup>A</sup>	78 ± 5,6 <sup>F</sup>
	150	13 ± 0,5 <sup>B</sup>	7 ± 0,7 <sup>A</sup>	76 ± 1,5 <sup>F</sup>
	250	13 ± 0,4 <sup>B</sup>	7 ± 0,4 <sup>A</sup>	80 ± 6,5 <sup>F</sup>
	500	13 ± 0,6 <sup>B</sup>	7 ± 0,0 <sup>A</sup>	76 ± 6,5 <sup>F</sup>
	1000	12 ± 1,1 <sup>B</sup>	7 ± 0,0 <sup>A</sup>	51 ± 4,4 <sup>E</sup>

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ ); ± desviación estándar; \* controles.

**Tabla 12. Acumulación de Na en biomasa de Cucurbitáceas cultivadas y silvestres.**

Especies	Tratamientos		Na acumulado en biomasa (ppm)		Factores	
	dS m <sup>-1</sup>	ppm	Aérea	Radicular	FBC	FT
CEC	* 2	* 0,0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	4	97,8	1305,0 ± 5,2 <sup>H</sup>	3039,6 ± 34,7 <sup>C</sup>	44,4 ± 0,10 <sup>K</sup>	0,43 ± 0,00 <sup>H</sup>
	8	309,7	2109,3 ± 2,5 <sup>I</sup>	3162,6 ± 32,4 <sup>D</sup>	17,0 ± 0,09 <sup>F</sup>	0,67 ± 0,01 <sup>K</sup>
	12	529,7	3076,0 ± 27,1 <sup>J</sup>	4247,3 ± 28,1 <sup>F</sup>	13,8 ± 0,09 <sup>E</sup>	0,73 ± 0,01 <sup>M</sup>
	16	741,6	3768,0 ± 7,9 <sup>K</sup>	6533,3 ± 83,2 <sup>I</sup>	13,9 ± 0,03 <sup>E</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>J</sup>
CLA	* 2	* 0,0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	4	97,8	371,6 ± 3,1 <sup>D</sup>	3252,6 ± 18,7 <sup>E</sup>	37,1 ± 0,24 <sup>J</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>E</sup>
	8	309,7	458,6 ± 4,1 <sup>E</sup>	5375,3 ± 30,6 <sup>G</sup>	18,8 ± 0,08 <sup>G</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>D</sup>
	12	529,7	393,3 ± 7,3 <sup>D</sup>	5462,6 ± 58,4 <sup>H</sup>	11,1 ± 0,01 <sup>C</sup>	0,07 ± 0,00 <sup>C</sup>
	16	741,6	810,3 ± 11,5 <sup>G</sup>	6663,3 ± 90,9 <sup>J</sup>	10,1 ± 0,04 <sup>B</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>E</sup>
CME	* 2	* 0,0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	4	97,8	5407,6 ± 6,6 <sup>L</sup>	7245,0 ± 52,0 <sup>L</sup>	129,5 ± 0,51 <sup>M</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>N</sup>
	8	309,7	6455,0 ± 26,5 <sup>M</sup>	9340,0 ± 80,0 <sup>O</sup>	51,0 ± 0,04 <sup>L</sup>	0,69 ± 0,01 <sup>L</sup>
	12	529,7	6680,0 ± 10,0 <sup>N</sup>	12966,6 ± 40,4 <sup>P</sup>	37,1 ± 0,07 <sup>J</sup>	0,52 ± 0,00 <sup>I</sup>
	16	741,6	7441,6 ± 30,6 <sup>O</sup>	14650,0 ± 207,8 <sup>Q</sup>	29,8 ± 0,08 <sup>I</sup>	0,51 ± 0,00 <sup>I</sup>
CMO	* 2	* 0,0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	4	97,8	227,6 ± 2,1 <sup>B</sup>	856,6 ± 25,1 <sup>B</sup>	11,1 ± 0,14 <sup>C</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>G</sup>
	8	309,7	338,3 ± 1,5 <sup>C</sup>	6851,6 ± 45,8 <sup>K</sup>	23,2 ± 0,03 <sup>H</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>B</sup>
	12	529,7	686,0 ± 9,5 <sup>F</sup>	9259,6 ± 40,0 <sup>N</sup>	18,8 ± 0,07 <sup>G</sup>	0,07 ± 0,00 <sup>C</sup>
	16	741,6	1340,0 ± 6,2 <sup>H</sup>	8166,6 ± 82,3 <sup>M</sup>	12,8 ± 0,03 <sup>D</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>F</sup>

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ );  $\pm$  desviación estándar; \* controles; FBC= Factor de bioconcentración; FT= Factor de traslocación.

**Tabla 13. Acumulación de Pb en biomasa de Cucurbitáceas cultivadas y silvestres.**

Especies	Tratamientos (ppm)	Pb acumulado en biomasa (ppm)		Factores	
		Aérea	Radicular	FBC	FT
CEC	* 0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	150	44,2 ± 0,5 <sup>C</sup>	1594,2 ± 12,3 <sup>D</sup>	10,9 ± 0,09 <sup>H</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>D</sup>
	250	58,9 ± 0,1 <sup>E</sup>	1004,4 ± 3,4 <sup>C</sup>	4,2 ± 0,02 <sup>C</sup>	0,06 ± 0,00 <sup>G</sup>
	500	86,6 ± 0,3 <sup>G</sup>	2213,0 ± 21,7 <sup>E</sup>	4,6 ± 0,04 <sup>D</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>E</sup>
	1000	545,7 ± 2,3 <sup>N</sup>	4747,4 ± 14,3 <sup>I</sup>	5,2 ± 0,02 <sup>E</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>I</sup>
CLA	* 0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	3,6 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	150	34,4 ± 0,2 <sup>B</sup>	426,3 ± 0,5 <sup>B</sup>	3,0 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>H</sup>
	250	46,7 ± 1,0 <sup>C</sup>	1009,4 ± 13,8 <sup>C</sup>	4,2 ± 0,05 <sup>C</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>F</sup>
	500	60,4 ± 0,0 <sup>F</sup>	1450,6 ± 10,8 <sup>D</sup>	3,0 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>E</sup>
	1000	204,7 ± 0,7 <sup>K</sup>	16598,9 ± 51,4 <sup>M</sup>	16,9 ± 0,06 <sup>L</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>B</sup>
CME	* 0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	150	55,8 ± 0,1 <sup>D</sup>	2671,6 ± 12,9 <sup>F</sup>	18,1 ± 0,09 <sup>M</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>C</sup>
	250	87,2 ± 0,7 <sup>G</sup>	2821,3 ± 27,1 <sup>F</sup>	11,6 ± 0,11 <sup>I</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>D</sup>
	500	148,5 ± 0,8 <sup>I</sup>	6652,4 ± 19,1 <sup>J</sup>	13,6 ± 0,04 <sup>J</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>C</sup>
	1000	328,3 ± 3,1 <sup>L</sup>	11124,0 ± 49,2 <sup>L</sup>	11,5 ± 0,05 <sup>I</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>D</sup>
CMO	* 0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	150	63,4 ± 0,3 <sup>F</sup>	2684,9 ± 2,9 <sup>F</sup>	18,3 ± 0,02 <sup>M</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>C</sup>
	250	100,6 ± 0,6 <sup>H</sup>	3680,4 ± 65,6 <sup>H</sup>	15,1 ± 0,26 <sup>K</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>D</sup>
	500	157,1 ± 2,7 <sup>J</sup>	3254,4 ± 13,4 <sup>G</sup>	6,8 ± 0,03 <sup>F</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>F</sup>
	1000	484,1 ± 1,2 <sup>M</sup>	9163,7 ± 54,0 <sup>K</sup>	9,7 ± 0,05 <sup>G</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>F</sup>

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ ); ± desviación estándar; \* controles; FBC= Factor de bioconcentración; FT= Factor de traslocación.



**Tabla 14. Variables agronómicas evaluadas con HMA a la séptima semana después de la inoculación en CEC y CME.**

Elementos	Especies	Tratamientos	Altura (cm)	Número de hojas	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
Na (dS m <sup>-1</sup> )	CEC	* 2	155 ± 36,0 <sup>C</sup>	15 ± 2,1 <sup>B</sup>	36 ± 6,6 <sup>A</sup>
		4	108 ± 22,8 <sup>B</sup>	12 ± 1,7 <sup>A</sup>	44 ± 4,5 <sup>A</sup>
		8	102 ± 19,8 <sup>B</sup>	12 ± 1,1 <sup>A</sup>	44 ± 5,5 <sup>A</sup>
		12	110 ± 14,7 <sup>B</sup>	13 ± 1,7 <sup>A</sup>	45 ± 9,4 <sup>A</sup>
		16	122 ± 17,7 <sup>C</sup>	14 ± 1,7 <sup>A</sup>	48 ± 9,8 <sup>A</sup>
	CME	* 2	99 ± 17,4 <sup>B</sup>	14 ± 1,7 <sup>A</sup>	34 ± 7,3 <sup>A</sup>
		4	83 ± 11,1 <sup>A</sup>	11 ± 0,8 <sup>A</sup>	28 ± 4,9 <sup>A</sup>
		8	97 ± 12,8 <sup>B</sup>	12 ± 1,6 <sup>A</sup>	31 ± 10,7 <sup>A</sup>
		12	106 ± 11,5 <sup>B</sup>	12 ± 1,8 <sup>A</sup>	39 ± 17,6 <sup>A</sup>
		16	118 ± 26,5 <sup>C</sup>	14 ± 2,5 <sup>A</sup>	46 ± 16,9 <sup>A</sup>
Pb (ppm)	CEC	* 0	173 ± 25,7 <sup>B</sup>	18 ± 1,2 <sup>C</sup>	72 ± 15,4 <sup>D</sup>
		150	146 ± 21,5 <sup>A</sup>	16 ± 1,3 <sup>C</sup>	49 ± 2,1 <sup>C</sup>
		250	171 ± 21,3 <sup>B</sup>	17 ± 2,3 <sup>C</sup>	73 ± 4,4 <sup>D</sup>
		500	176 ± 33,4 <sup>B</sup>	17 ± 2,3 <sup>C</sup>	89 ± 6,3 <sup>D</sup>
		1000	189 ± 36,4 <sup>B</sup>	18 ± 2,3 <sup>C</sup>	134 ± 19,3 <sup>E</sup>
	CME	* 0	100 ± 11,2 <sup>A</sup>	10 ± 1,6 <sup>A</sup>	24 ± 2,5 <sup>A</sup>
		150	164 ± 55,4 <sup>B</sup>	14 ± 1,7 <sup>A</sup>	58 ± 1,3 <sup>C</sup>
		250	160 ± 23,7 <sup>B</sup>	16 ± 2,6 <sup>C</sup>	27 ± 7,2 <sup>A</sup>
		500	176 ± 23,8 <sup>B</sup>	17 ± 1,7 <sup>C</sup>	39 ± 6,3 <sup>B</sup>
		1000	147 ± 25,8 <sup>A</sup>	15 ± 2,4 <sup>B</sup>	59 ± 5,6 <sup>C</sup>

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ );  $\pm$  desviación estándar; \* controles.

**Tabla 15. Clorofila evaluada con HMA a la séptima semana después de la inoculación.**

Elementos	Especies	Tratamientos	Clorofila
Na (dS m <sup>-1</sup> )	CEC	*2	9,89 ± 3,9 <sup>C</sup>
		4	6,80 ± 1,4 <sup>B</sup>
		8	7,18 ± 2,1 <sup>B</sup>
		12	8,06 ± 0,7 <sup>B</sup>
		16	8,73 ± 1,9 <sup>B</sup>
	CME	*2	27,42 ± 4,2 <sup>D</sup>
		4	6,32 ± 1,4 <sup>B</sup>
		8	5,18 ± 1,4 <sup>A</sup>
		12	5,71 ± 1,4 <sup>B</sup>
		16	5,84 ± 0,7 <sup>B</sup>
Pb (ppm)	CEC	*0	13,31 ± 1,5 <sup>C</sup>
		150	17,80 ± 2,7 <sup>E</sup>
		250	13,64 ± 1,0 <sup>D</sup>
		500	14,01 ± 4,0 <sup>D</sup>
		1000	17,38 ± 2,0 <sup>E</sup>
	CME	*0	23,37 ± 5,0 <sup>F</sup>
		150	8,26 ± 1,0 <sup>A</sup>
		250	9,12 ± 1,1 <sup>A</sup>
		500	9,57 ± 1,0 <sup>B</sup>
		1000	11,63 ± 0,8 <sup>C</sup>

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ );  $\pm$  desviación estándar; \* controles.

**Tabla 16. Acumulación de Na y Pb sobre melón (CME) y alamama (CEC) usando HMA determinados en biomasa aérea y radicular.**

Especies/ Elementos	Tratamientos		Na y Pb acumulado en la biomasa (ppm)		Factores	
	dS m <sup>-1</sup>	ppm	Aérea	Radicular	FBC	FT
CEC/ Na	* 2	* 0,0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	4	97,8	499,0 ± 5,2 <sup>B</sup>	1636,0 ± 18,1 <sup>B</sup>	21,8 ± 0,23 <sup>H</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>C</sup>
	8	309,7	615,0 ± 5,3 <sup>C</sup>	2163,0 ± 12,0 <sup>C</sup>	8,9 ± 0,06 <sup>D</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>C</sup>
	12	529,7	756,3 ± 5,5 <sup>D</sup>	2789,0 ± 28,8 <sup>D</sup>	6,7 ± 0,06 <sup>C</sup>	0,27 ± 0,00 <sup>C</sup>
	16	741,6	669,3 ± 60,6 <sup>C</sup>	2750,0 ± 16,5 <sup>D</sup>	4,6 ± 0,06 <sup>B</sup>	0,24 ± 0,03 <sup>B</sup>
CME/ Na	* 2	* 0,0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	4	97,8	2999,0 ± 13,8 <sup>E</sup>	3210,0 ± 13,8 <sup>E</sup>	63,5 ± 0,28 <sup>I</sup>	0,94 ± 0,01 <sup>E</sup>
	8	309,7	3061,0 ± 46,9 <sup>E</sup>	3145,0 ± 46,9 <sup>E</sup>	20,0 ± 0,18 <sup>G</sup>	0,97 ± 0,02 <sup>E</sup>
	12	529,7	3266,0 ± 37,2 <sup>F</sup>	4111,0 ± 37,3 <sup>F</sup>	13,9 ± 0,07 <sup>F</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>D</sup>
	16	741,6	3917,0 ± 76,1 <sup>G</sup>	4764,0 ± 76,1 <sup>G</sup>	11,7 ± 0,06 <sup>E</sup>	0,82 ± 0,02 <sup>D</sup>
CEC/ Pb	* 0	* 0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	150	150	18,1 ± 0,7 <sup>C</sup>	244,6 ± 3,8 <sup>B</sup>	1,8 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>F</sup>
	250	250	42,3 ± 0,8 <sup>G</sup>	1020,0 ± 7,3 <sup>D</sup>	4,3 ± 0,03 <sup>G</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>E</sup>
	500	500	49,4 ± 0,7 <sup>H</sup>	1911,6 ± 77,2 <sup>F</sup>	3,9 ± 0,15 <sup>F</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>D</sup>
	1000	1000	110,8 ± 0,1 <sup>I</sup>	4755,3 ± 18,6 <sup>H</sup>	4,9 ± 0,02 <sup>H</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>C</sup>
CME/ Pb	* 0	* 0	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	00,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,00 <sup>A</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	150	150	15,9 ± 0,5 <sup>B</sup>	532,0 ± 24,3 <sup>C</sup>	3,7 ± 0,16 <sup>C</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>D</sup>
	250	250	22,9 ± 0,1 <sup>D</sup>	570,7 ± 5,4 <sup>C</sup>	2,4 ± 0,02 <sup>H</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>E</sup>
	500	500	25,7 ± 0,4 <sup>E</sup>	1510,6 ± 20,9 <sup>E</sup>	3,1 ± 0,04 <sup>G</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>C</sup>
	1000	1000	35,0 ± 0,4 <sup>F</sup>	3098,1 ± 22,9 <sup>G</sup>	3,1 ± 0,03 <sup>D</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>B</sup>

Letras distintas en la misma hilera indican diferencias estadísticas significativas según test de Tukey ( $p < 0,05$ ); ± desviación estándar; \* controles; FBC= Factor de bioconcentración; FT= Factor de traslocación.