



4  
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

EFEECTO DE LA DOBLE INOCULACION,  
ENDOMICORRIZA V-A Y *Azospirillum* EN CULTIVOS  
DE MAIZ (*Zea mays*) DE DOS SITIOS DEL ESTADO  
DE MEXICO.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A N :  
**VIANNEY ARROYO AVILA**  
**MIRIAM MARTINEZ GOMEZ**

DIRECTOR DE TESIS: BIOL. MA. DE JESUS SANCHEZ COLIN

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LA UNIDAD ES  
DE NUESTRA DESTINO

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **DEDICATORIAS**

### **A MIS PADRES**

*Gloria Avila Díaz y Eulalio Arroyo Atristain  
Con gratitud y cariño. Por su esfuerzo y apoyo brindado, que  
hicieron, posible lograr una de mis mas grandes metas en la  
vida, que constituye la herencia mas valiosa que pudiera  
recibir.*

### **A MI HERMANA**

*Nancy  
Como muestra de cariño, por todo el camino que llevamos  
juntas.*

### **A LA MEMORIA DE MI HERMANO**

*Alfonso  
Con profundo amor, por los momentos y recuerdos felices.*

### **A TODOS MIS FAMILIARES**

*Abuelos, tíos y primos  
Que de una u otra forma me apoyaron, siempre.*

### **A MIS MEJORES AMIGOS**

*Victor por su apoyo que me brindó en el trabajo,  
proporcionándome parte de su tiempo, a Maribel, Miriam,  
Alma, Patricia, Marco, Alejandro, Manuel y Gonzalo, que  
siempre tuvieron una frase de aliento, hasta el último momento  
y sobre todo por lo que hemos pasado juntos.*

**A MIS PADRES**

*Antonia Gómez Ramírez, Francisco Martínez García  
Dedico la tesis y agradezco su confianza, aliento,  
esfuerzo moral y económico brindados durante mis  
estudios. Sin los cuales no hubiera podido realizar una  
de mis mayores metas, concluir mis estudios  
profesionales.*

**A MIS HERMANOS**

*Patricia, Anabell, Paco, Daniel y Fabiola  
Agradezco su apoyo e impulso en mis actividades  
escolares.*

**A LA MEMORIA DE MI ABUELO**

*José Gómez Jalpa  
Quien con su afecto y consejos me guió por este camino.*

**A MI SOBRINA**

*Elisell Vega Martínez  
Con amor para que me recuerde ...*

**A MIS AMIGOS**

*Vianney, Víctor, Gonzalo, Maribel, Alma, Rommel y  
Marco, para que siempre recordemos que no importa lo  
que fuimos, sino lo que somos y podemos llegar a ser.*

**MIRIAM**

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias por mi lugar en las aulas, por la educación y la cultura, por el presente y el futuro.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Campus II por haber sido sede de mi formación y ejercicio profesional.*

*A todo el profesorado gracias por sus enseñanzas, profesionalismo y sugerencias sin las cuales no hubiera sido posible concluir la carrera.*

*A la Biol. María de Jesús Sánchez Colín, por su incalculable apoyo así como por su profesionalismo, consejos y estímulo, por los cuales se concluyó este trabajo.*

*Un especial agradecimiento por su hospitalidad y facilidades en la realización de la parte experimental en campo de la tesis, a los Srs. Pablo y Rodolfo (de Las Peñas, Villa Victoria), a Don José y su familia (Las Mesas de Zacango, Villa de Allende).*

*Con respeto y gratitud al Ing. Sergio Trueba Castillo, por la enseñanza, apoyo y contribución brindados en el trabajo de tesis.*

*A cada uno de nuestros sinodales, M. en C. Gerardo Cruz Flores, Biol. Rubén Zulbarán Rosales, M. en C. Rosalva García Sánchez y Biol. Elvia García Santos, por sus finas atenciones, valiosas sugerencias, orientación y apoyo en el proceso de elaboración de esta tesis.*

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	6
Rizósfera.....	6
Endomicorrizas V-A.....	8
Morfología VAM.....	8
Desarrollo de la infección VAM.....	11
Factores que intervienen en la colonización del hongo MVA.....	13
Función de MVA.....	16
Prácticas de fertilización.....	21
Respuesta del cultivo a la inoculación.....	22
Importancia del fósforo en la planta.....	22
Azospirillum.....	24
Características de <u>Azospirillum</u> .....	24
Bioquímica y fisiología de <u>Azospirillum</u> .....	24
Colonización radicular por <u>Azospirillum</u> .....	25
Mecanismos de acción de <u>Azospirillum</u> sobre el crecimiento vegetal.....	27
Factores que afectan la actividad de <u>Azospirillum</u> .....	29
Distribución ecológica.....	32
Interacción de <u>Azospirillum</u> con microorganismos de la rizósfera.....	32
<u>Azospirillum</u> como competidor en la rizósfera.....	33
Interacción de <u>Azospirillum</u> con las partículas del suelo.....	34
Aspectos agrotécnicos.....	35
Maíz.....	36
Descripción botánica.....	36
Adaptación.....	42
Utilización e importancia.....	43
Andisoles.....	46
Propiedades.....	46
Adsorción de fosfatos.....	48
Mecanismos de adsorción de fosfatos.....	48
Efectos de la acidez del suelo sobre las plantas.....	49

<i>Efectos de la cal sobre el suelo</i> .....	49
<i>Funciones de la composta en el suelo</i> .....	50
<b>ANTECEDENTES</b> .....	52
<b>OBJETIVOS</b> .....	55
<i>General</i> .....	55
<i>Particulares</i> .....	55
<b>SUPUESTO E HIPÓTESIS</b> .....	55
<b>DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO</b> .....	56
<i>Localización</i> .....	56
<i>Geología</i> .....	56
<i>Suelos</i> .....	56
<i>Clima</i> .....	58
<i>Vegetación</i> .....	58
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	59
<i>Fase de gabinete</i> .....	59
<i>Fase de campo</i> .....	59
<i>Fase de laboratorio</i> .....	62
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	64
<i>Las Peñas, Villa Victoria</i> .....	68
<i>Las Mesas de Zacango, Villa de Allende</i> .....	70
<b>CONCLUSIONES</b> .....	79
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	80
<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA</b> .....	81
<b>ANEXO</b>	
<i>Preparación de una composta</i> .....	I
<i>Evaluación de la colonización micorrízica</i> .....	I
<i>Observación de <u>Azospirillum</u></i> .....	III
<i>Soluciones</i> .....	IV
<b>APÉNDICE</b> .....	VII
<i>Las Peñas, Villa Victoria</i> .....	VII
<i>Las Mesas de Zacango, Villa de Allende</i> .....	XI

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Tipos de micorrizas.....</i>	<i>9</i>
<i>Tabla 2. Arreglo de los tratamientos aplicados a cultivos experimentales de maíz en los ejidos de Las Peñas y Las Mesas de Zacango, Estado de México.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 3. Propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo determinadas en los ejidos de Las Peñas y Las Mesas de Zacango.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 4. Propiedades físicas y químicas del suelo cultivado con maíz en los ejidos de Las Peñas y Las Mesas de Zacango, Estado de México.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 5. Propiedades del suelo determinadas antes y después del encalado aplicado en los sitios de siembra de Las Peñas y Las Mesas de Zacango, Estado de México.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 6. Características de las zonas de trabajo.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 7. Porcentaje promedio de P y N foliar en plantas de maíz en Las Peñas y Las Mesas.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 8. Determinaciones promedio por grupo de tratamientos en Las Peñas.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 9. Determinaciones promedio por grupo de tratamientos en Las Mesas.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla A. Porcentaje de fósforo foliar en maíz de Las Peñas.....</i>	<i>VII</i>
<i>Tabla B. Porcentaje de nitrógeno foliar en maíz de Las Peñas.....</i>	<i>VIII</i>
<i>Tabla C. Altura de la parte aérea de las plantas en Las Peñas.....</i>	<i>VIII</i>
<i>Tabla D. Peso de raíz de las plantas en Las Peñas.....</i>	<i>IX</i>
<i>Tabla E. Rendimiento de grano seco de maíz en Las Peñas.....</i>	<i>IX</i>
<i>Tabla F. Análisis estadístico realizado para los datos de rendimiento de grano seco de maíz en Las Peñas.....</i>	<i>X</i>
<i>Tabla G. Porcentaje de fósforo foliar en maíz de Las Mesas de Zacango.....</i>	<i>XI</i>
<i>Tabla H. Porcentaje de nitrógeno foliar en maíz de Las Peñas.....</i>	<i>XII</i>
<i>Tabla I. Altura de la parte aérea de las plantas en Las Mesas de Zacango.....</i>	<i>XII</i>
<i>Tabla J. Peso de raíz de las plantas en Las Mesas de Zacango.....</i>	<i>XIII</i>
<i>Tabla K. Rendimiento de grano seco de maíz en Las Mesas de Zacango.....</i>	<i>XIII</i>
<i>Tabla L. Análisis estadístico realizado para los datos de rendimiento de grano seco de maíz en Las Mesas.....</i>	<i>XIV</i>

**Tabla L. Análisis estadístico realizado para los datos de  
rendimiento de grano seco de maíz en Las Mesas .....XIV**

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<i>Figura 1.</i>	<i>Principales formas de las micorrizas asociadas a las raíces de plantas superiores.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2.</i>	<i>Infección micorrízica.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3.</i>	<i>Germinación, plántula y planta adulta de maíz.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 4.</i>	<i>Estructura de una planta adulta de maíz.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 5.</i>	<i>Estructura de una hoja de maíz.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 6.</i>	<i>Estructuras florales en el maíz.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 7.</i>	<i>Estructura del grano de maíz maduro e infrutescencia.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 8.</i>	<i>Mazorca completa de maíz y corte longitudinal.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 9.</i>	<i>Localización de los ejidos Las Peñas y Las Mesas de Zacango en los Municipios de Villa Victoria y Villa de Allende, respectivamente.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 10.</i>	<i>Promedio de los porcentajes de colonización micorrízica total en plantas de Las Peñas.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 11.</i>	<i>Altura promedio de la parte aérea de las plantas en Las Peñas.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 12.</i>	<i>Peso promedio de la raíz de las plantas en Las Peñas.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 13.</i>	<i>Promedio de los porcentajes de colonización micorrízica total en plantas de Las Mesas.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 14.</i>	<i>Altura promedio de la parte aérea de las plantas en Las Mesas de Zacango.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 15.</i>	<i>Peso promedio de la raíz de las plantas en Las Mesas de Zacango.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 16.</i>	<i>Promedio de los porcentajes de colonización micorrízica arbuscular y vesicular en plantas de Las Peñas.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 17.</i>	<i>Promedio de los porcentajes de colonización micorrízica arbuscular y vesicular en plantas de Las Mesas de Zacango.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 18.</i>	<i>Número promedio de esporas en ambos sitios y en las temporadas seca y húmeda.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 19.</i>	<i>Rendimiento promedio del grano seco de maíz en los dos sitios.....</i>	<i>76</i>

---

## RESUMEN

Con el fin de conocer la eficiencia de la relación simbiótica entre hongos endomicorrízicos, bacterias *Azospirillum* y cultivos de maíz se estableció un diseño experimental con 12 tratamientos y 3 repeticiones distribuidas completamente al azar. Las variables fueron: 1) el sitio, 2) con y sin inóculos de hongos MVA y *Azospirillum*, 3) dosis de fósforo (0, 40 y 60 Kg/Ha) y 4) dosis de nitrógeno (0 y 80 Kg/Ha). Se cuantificó el requerimiento de cal (método de Incubación), se aplicó calidra -Ca(OH)<sub>2</sub> con dosis de 1.5 y 1.0 Ton/Ha en Las Peñas, Villa Victoria y Las Mesas, Villa de Allende, respectivamente. Se determinaron algunas propiedades físicas y químicas del suelo: Textura, DA, DR, % de EP, % de humedad, % de MO, pH, N total y P aprovechable, además de los porcentajes de colonización MVA (método de Phillips y Hayman), número de esporas del suelo (método del pipeteo), altura de la planta (cm), acumulación (%) de P foliar (método Vanadato-Molibdato), contenido (%) de N foliar (método de microkjeldhal) y rendimiento de grano seco (ton/ha).

El suelo de ambos sitios presenta deficiencia de P (4 62 ppm), pH ligeramente ácido (5.04), altos contenidos de MO (8 14 %), N total (0 12 %) y baja DA (0 80 g/cc). Se observó la infección MVA en todos los tratamientos. Durante los 4 primeros meses mayor porcentaje de colonización arbuscular, posteriormente, predominó el vesicular. El número de esporas aumentó de la temporada seca a la lluviosa, presentándose los géneros *Glomus* y *Acaulospora*.

En Las Peñas, la inoculación favoreció el rendimiento en 4 de los 13 tratamientos: M-A-0-60, M-80-40, A, M-A-0-40, sin diferencia significativa entre ellos. La mayor altura de la planta se observó en las parcelas que no tenían P (M-80 y 80). La acumulación de N foliar (determinado en floración) fue alto en M-80, seguido de A y A-0-60, estadísticamente iguales, debido posiblemente, a que el suelo es rico en nitrógeno y al nitrógeno atmosférico fijado por *Azospirillum*. Las plantas con mayor peso de raíz fueron las fertilizadas con la mayor dosis de P y presencia de nitrógeno: M-80-60, 80-60 y A-0-40, en este último tratamiento consideramos que *Azospirillum* sustituyó la aplicación de nitrógeno. En cuanto al contenido de P foliar sobresalieron los tratamientos con dosis de P (M-80-40, M-A-0-60, M-A-0-40, A-0-60), para el tratamiento A-0-60 posiblemente los hongos MVA nativos fueron los que favorecieron la absorción de P a la planta. Respecto al establecimiento de la infección MVA, inicialmente fue bajo el porcentaje de colonización total (los 2 primeros meses), aumentando en las últimas etapas de desarrollo del maíz.

En Las Mesas de Zacango destacan, sin diferencia significativa, los tratamientos M-80-60, 80-40 y 80-60 en rendimiento, altura de la planta y peso de raíz. Los porcentajes de colonización micorrízica total fueron altos en todas las etapas de desarrollo del maíz y en todos los tratamientos. El mayor contenido de N foliar fue de los tratamientos M-80-40, 80-40 y A-0-60, en este último caso

consideramos que *Azospirillum* participó en la absorción de N a la planta. El porcentaje de P foliar fue significativamente alto en A, 80-40, A-0-40 y M-80, para los tratamientos que no fueron fertilizados con P, consideramos que las micorrizas, explorando un mayor volumen del suelo, captaron el P para la planta. Las parcelas con doble inoculación se caracterizaron por ser las de menor rendimiento, altura de la planta, peso de raíz y N foliar, posiblemente esto se debe a la competencia que hubo por el área cortical del maíz entre todos los simbiotes, tanto nativos como introducidos.

El suelo de ambos sitios presentó las principales características de un Andisol. El encalado aumentó en una unidad el pH de ambos sitios, mejorando la actividad microbiológica del suelo, sobre todo en Las Peñas, donde se observó mejor la respuesta a la doble inoculación. Los rendimientos se vieron favorecidos por la doble inoculación y la aplicación de P en Las Peñas, y por la fertilización con N y P en Las Mesas. El porcentaje de colonización MVA fue más alto en Las Mesas que en Las Peñas.

## **INTRODUCCIÓN**

La degradación de nuestros recursos ha provocado la disminución en la productividad de los mismos ya que enfrentamos problemas como la pérdida de bosques, selvas y matorrales y la contaminación de suelos, agua y aire, (Lozano y López, 1994). Particularmente, la agricultura ha sido la actividad esencial para la supervivencia y el bienestar humanos. También ha sido el sector económico que más ha afectado al ambiente natural y que más depende de él. Con la aceleración de la demanda alimenticia a causa del crecimiento de la población, el cambio tecnológico y la falta de oportunidades alternas de empleo en las zonas rurales, se ha intensificado el conflicto entre la agricultura y el medio (FAO, 1991c)

Siendo el principal problema la alimentación de la población, que está creciendo a una tasa del 2% anual, duplicándose cada generación, es preciso un aumento de la producción de alimentos del 3% al año. Una cuestión de importancia fundamental es la manera de incrementar la producción protegiendo al mismo tiempo el ambiente y la capacidad productiva de los recursos de tierras y aguas.

El único sistema para evitar el sufrimiento humano en gran escala en el futuro está en la agricultura y desarrollo rural sostenible cuyo objetivo es la satisfacción de las necesidades de las generaciones presentes sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para atender las suyas (Ortega y Cortina, 1991). La importancia que se concede al desarrollo sostenible responde a la creciente preocupación por la degradación del suelo y escasez perenne de alimentos, entre otras (FAO, 1991a).

La agricultura sostenible debe emplear sistemas de cultivo y de producción animal que sean apropiados, así como los insumos necesarios para explotar, la productividad natural de los sitios sin perder de vista la necesidad de preservar la calidad de la tierra y la viabilidad económica y social de la actividad. Para alcanzar estos objetivos, la agricultura sostenible debe basarse en los sólidos principios agronómicos que se han desarrollado a través del tiempo, como son: control de la erosión, uso de especies y variedades adecuadas, control racional de plagas, enfermedades y malezas, reducción y eliminación del movimiento de solutos fuera de la zona radical y suministro adecuado de nutrimentos para completar la capacidad natural de abastecimiento del suelo y satisfacer la demanda impuesta por las plantas. Es este último aspecto el que concita nuestra atención.

Por lo general, el suelo es incapaz de suministrar todos los elementos en las cantidades apropiadas para que los cultivos expresen el máximo rendimiento que las condiciones del medio permitan. Ejemplo de elementos nutrimentales que comúnmente son deficitarios en el suelo son: el fósforo, nitrógeno y potasio. Una forma de suplir el déficit es complementando el aporte natural, lo cual se hace con fertilizantes, estiércoles, desechos urbanos, abonos verdes y manejo adecuado de

los residuos (Etchevers, 1991). Específicamente, el uso de ciertos fertilizantes provoca o agrava la acidificación, el descenso de la fertilidad y la reducción del rendimiento del suelo (FAO, 1991b).

Particularmente, los Andisoles presentan problemas como niveles bajos de pH, fijación de fósforo y lenta descomposición de ácidos orgánicos que provocan una acumulación de materia orgánica que a su vez dificulta la liberación de los elementos que la conforman y que pueden ser aprovechados por los cultivos (Vergara, 1992).

La agricultura sostenible propone el uso de compostas y abonos orgánicos que aportan nutrientes, mejoran las condiciones físicas y estimulan la actividad microbiana del suelo (Nuñez, 1991), así los organismos metabólicamente activos, como los hongos endomicorrizos vesículo-arbusculares (VAM) y bacterias fijadoras de nitrógeno *Azospirillum*, facilitan la absorción de nutrientes del suelo, participando en la fertilidad del mismo y por ende, en la producción de cultivos (Alexander, 1990).

Los hongos VAM forman MICORRIZAS (relación simbiótica mutualista) con las raíces de algunas plantas vasculares (Sieverding, 1991). Este tipo de simbiosis permite a muchas especies que crecen en suelos deficientes de o con problemas para la asimilación de fósforo y otros nutrientes poco móviles, absorberlos con mayor eficiencia que en ausencia de micorriza. Además pueden aumentar la velocidad de conducción de agua en las plantas, mejorar la tolerancia a sequías y favorecer una rehidratación más rápida de éstas después del estrés hídrico (Guzmán y Ferrera, 1990). A cambio el hongo recibe de la planta algunos carbohidratos (Sieverding, 1991).

Las bacterias del género *Azospirillum* son de vida libre, aerobias y fijadoras de nitrógeno (Sprent y Sprent, 1990), colonizan la raíz de algunas plantas inter o externamente provocando cambio no aparentes en la célula del cortex. Se ha observado que su presencia en gramíneas incrementa el total de plantas, el peso seco de éstas, la cantidad de nitrógeno en las plántulas y en granos así como el número de semillas fértiles y el total de éstas, el tiempo de floración es más rápido incrementando el número de mazorcas y granos en la misma, aumenta el peso de grano, la altura de la planta, la talla de la hoja y la reacción a la germinación es mayor (Bashan y Levanony, 1990).

Algunas gramíneas han estado estrechamente asociadas a los orígenes de grandes civilizaciones. Específicamente el maíz ha sido alimento, moneda y religión para el pueblo de México. Durante siglos la historia nacional y las condiciones de vida de los mexicanos han estado relacionadas a su cultivo. México fue el centro primario de origen, domesticación y dispersión a otras regiones de América del Sur hace 5 ó 6 mil años. Una hipótesis asegura que el maíz es un híbrido natural entre el *teocintle* y una gramínea ya extinguida (Miranda, 1996). En el México moderno, el maíz representa el componente más importante de la producción agrícola, pues ocupa aproximadamente la mitad de la superficie destinada a la agricultura. De los 14.4 millones de hectáreas cultivadas en el territorio nacional en 1991, un total de

6.8 millones correspondieron al maíz (47.2%), lo cual representa el 75.2% del volumen de la producción agrícola. En México 2.6 millones de personas se dedican al cultivo del maíz, cifra que equivale al 68% de la población ocupada en todo el sector agropecuario (Figueroa *et al.*, 1994).

En los últimos años el costo de productos agroquímicos se intensificó, además de contaminar el medio ambiente; por lo que es necesario implementar otras técnicas de producción que permitan obtener buenos rendimientos con el menor deterioro del medio, una técnica es el uso de hongos endomicorrízicos arbusculares y bacterias *Azospirillum* que en interacción simbiótica con las raíces de las plantas, incrementan la eficiencia en la absorción de nutrimentos principalmente fósforo y nitrógeno. Las interacciones entre micorrizas arbusculares, *Azospirillum* y maíz han sido poco estudiadas. Sin embargo se ha encontrado que las gramíneas pueden formar simbiosis doble ó mixta, con éstos microorganismos aumentando significativamente el abastecimiento de nutrimentos a las plantas de maíz, que se desarrolla en suelos donde la disponibilidad de fósforo y nitrógeno es una limitante para el desarrollo de éste cultivo, de ahí la importancia que al inocular con hongos micorrízicos arbusculares y *Azospirillum* se pueda reemplazar o disminuir la fertilización química de nitrógeno y fósforo (Al-Nahidh y Gomah, 1991)

## MARCO TEÓRICO

### RIZÓSFERA

En 1904 Hiltner introdujo el término de RIZÓSFERA para describir la región del suelo que se relaciona biológicamente con las raíces de las plantas. La porción apical de crecimiento representa una pérdida considerable de materiales y posiblemente el 20% de la producción fotosintética de las plantas pase a los suelos a través de las raíces. Estas pérdidas incluyen el polisacárido *mucigel* secretado por la coña de la raíz y por las células epidérmicas y corticales, de los exudados radicales de las células de pared fina, que proceden al ápice (Grant y Long, 1989). La mayor parte del mucigel es agua, pero también contiene materiales orgánicos que le dan cuerpo. Las poblaciones bacterianas rodean a las raíces, y pueden observarse en el interior del mucigel, por lo que no es posible definir la parte del mismo producida por la raíz y la elaborada por las bacterias. Con frecuencia, el mucigel hace de puente entre la raíz y una partícula de suelo adyacente. Probablemente, la mayor parte de los nutrimentos absorbidos por las plantas atraviesan una capa de mucigel, en muchas ocasiones, sin atravesar la simple película de agua que, desde hace tiempo se consideraba como el vehículo principal en el proceso de absorción de nutrimentos. Las bacterias que viven en el mucigel influyen, sin duda, en las propiedades de éste y tienen mucho que ver con la disponibilidad de nutrimentos y movimiento de iones a través del mismo (Thompson y Troeh, 1982).

La rizósfera se divide a menudo en dos áreas generales, la rizósfera más interior localizada en la superficie de las raíces y la rizósfera exterior que corresponde al suelo adyacente. Las cifras microbianas son mayores en la zona interior donde las interacciones bioquímicas entre los microorganismos en las raíces son más pronunciadas. La superficie de las raíces y el suelo adherido a ella es a veces llamada rizopiano. En la rizósfera y el rizopiano el organismo superior aporta productos de excreción y tejido muerto; la mayoría de las especies en la flora subterránea probablemente no tiene una influencia perjudicial sobre las plantas que las albergan. Considerándolo de esta manera se derivan ciertos beneficios de los organismos microscópicos. (Alexander, 1990).

El considerar la rizósfera como una comunidad comensalística, donde los gérmenes son los únicos beneficiarios, implica una simplificación excesiva, ya que generalmente también las plantas reciben beneficios. Las ventajas potenciales que repercuten sobre las plantas han obtenido recientemente renovada atención, a partir del descubrimiento de la existencia de bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico en rizósfera, tales como el *Azotobacter paspali* y *Azospirillum brasilense*. También se ha estudiado el aporte de fosfatos y de otros iones incitados por el efecto de los contaminantes bacterianos en estos procesos las plantas cultivadas en agua. En

ambos casos, el aumento en el intercambio de nutrimentos hacia las plantas es incierto, y cualquier mejora en la respuesta pudiera ser debida a sustancias promotoras del crecimiento vegetal, sintetizadas por los microorganismos de la rizósfera. La formación de simbiosis micorrizica, una derivación del efecto de la rizósfera, produce asociaciones ecológicamente importantes. Estas son obligatorias por muchos hongos, pero frecuentemente facultativas para las plantas, que no las desarrollan necesariamente en condiciones ricas en nutrimentos (Grant y Long, 1989). Los hongos micorrizicos son abundantes en la rizósfera, absorben nutrimentos que traspasan a la planta, segregan hormonas que estimulan el crecimiento y contribuyen a la protección de la raíz frente a organismos patógenos. En compensación, las micorrizas dependen de la planta en los que se refiere a los carbohidratos (Thompson y Troeh, 1982)

## ENDOMICORRIZAS V-A

Las micorrizas se han clasificado en base a su estructura y morfología en dos grandes grupos: ECTOMICORRIZAS Y ENDOMICORRIZAS (tabla 1). El primer tipo se caracteriza por una modificación de la raíz que pierde sus pelos absorbentes. El hongo rodea la raíz con un manto de filamentos o micelio tabicado (Red de Harting). De este manto parte una red micelilar externa, más o menos desarrollada que se extiende por el suelo, y una red micelilar interna que penetra en la raíz, pero sin entrar en el interior de las células (Sieverding, 1991).

El segundo tipo de asociación micorrizica sólo provoca pocos cambios en la morfología de las raíces. No hay manto en torno a la raíz. Sin embargo, hay dos redes miceliarias, una externa y otra interna. El micelio penetra en la raíz intercelularmente y en el interior de las células radicales (intracelularmente). Dentro de este tipo existen seis grupos más (tabla 1), pero las más importantes y mayormente distribuidas (geográficamente) son las micorrizas VESICULO-ARBUSCULARES (MVA) (figura 4). Este tipo se encuentra en condiciones naturales en casi todos los cereales cultivados tropicales y templados (Sieverding, 1991).

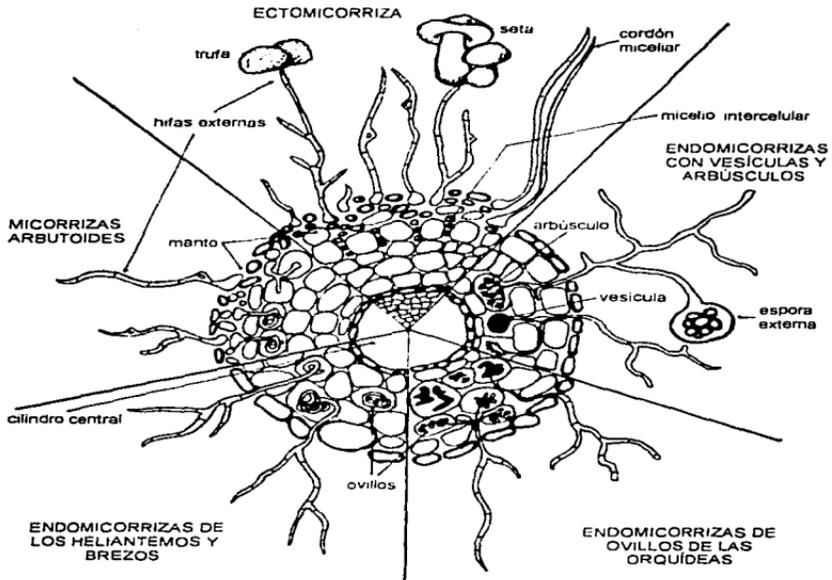
### Morfología MVA

Los hongos que forman MVA pertenecen a los géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Scutellospora*. Se caracterizan por la producción de hifas, vesículas y arbuscúlos en el parenquima radical. *Gigaspora* no produce vesículas en el interior de la raíz y *Glomus* puede formarlas intra o extraradicalmente. Las endomicorrizas se caracterizan por la presencia de una extensa red de micelio en el suelo, unida al sistema radical de las plantas hospederas. Esta estructura del hongo es la más importante para el aporte de elementos nutrimentales desde la solución del suelo y para el transporte de los mismos a la raíz. El micelio externo tiene una estructura dimórfica, con hifas de pared gruesa (20- 30  $\mu\text{m}$  de diámetro) y a menudo con protuberancias, de las que ramifican hifas finas (2-7  $\mu\text{m}$  de diámetro), de pared delgada y efímeras, las cuales se tornan ceptadas antes de morir (Guzmán y Ferrera, 1990). Rhodes y Gerdermann (1975) determinaron mediante  $^{32}\text{P}$  que el micelio puede extenderse en el suelo hasta una distancia a 7 cm de la raíz.

Los arbuscúlos son estructuras altamente ramificadas, típicamente intracelulares que se localizan en las células cercanas al cilindro vascular y cuya función es la transferencia de nutrimentos desde y hacia el hospedante. Los arbuscúlos están formados a partir de una hifa inter o intracelularmente mediante ramificaciones dicotómicas sucesivas hasta formar series de ramas bifurcadas de diámetro menor a 1  $\mu\text{m}$ .

Tabla 1. Tipos de micorrizas. (Tomado de Sieverding, 1991).

Tipos principales	Subtipos	Características estructurales	Familia a la que pertenece	Plantas hospederas
Ectomicorriza		Manto hifal alrededor de la raíz; red de Hartig (hifas entre células corticales)	Basidiomicetos; Ascomicetos; Ficomicetos	Árboles, matorrales de Gimnospermas y Angiospermas
Endomicorriza	Ectendomicorriza	Puede, pero no necesariamente, existir un manto hifal; red de Hartig; hifas enrolladas en células radiculares	Basidiomicetos; Ascomicetos	Árboles, matorrales de Gimnospermas y Angiospermas
	Micorriza arbutoide	Manto hifal; red de Hartig; hifas enrolladas en células	Basidiomicetos	Sólo en Ericales
	Micorriza monotropoide	Manto hifal; red de Hartig; haustorio no bifurcado en células; micelio incoloro	Basidiomicetos	Sólo en Monotropaceae
	Micorriza ericoide	Sin manto hifal, sin red de Hartig; hifas enrolladas en células	Ascomicetos (Basidiomicetos)	Sólo en Ericales
	Micorriza de las orquideas	Sin manto hifal; sin red de Hartig; hifas enrolladas en células; posible haustorio no bifurcado; micelio incoloro	Basidiomicetos	Sólo en Orquidaceae
	Micorriza vesículo-arbuscular	Sin manto hifal, sin red de Hartig; hifas enrolladas en células; haustorio finamente bifurcado (arbuscúlos); posible formación de vesículas en o entre células	Endogonaceae	Árboles, matorrales, gramíneas y herbáceas de Gimnospermas y Angiospermas; plantas inferiores (algas y helechos de las Briofitas y Ptenodofitas)



**Figura 1.** Principales formas de las micorrizas asociadas a las raíces de plantas superiores.

Arriba, las ectomicorrizas caracterizadas por la no penetración de los filamentos subterráneos del hongo en las células radicales. Abajo, los tres tipos de endomicorrizas y el tipo intermedio, las ecto-endomicorrizas (a la izquierda). Siguiendo el sentido de rotación de las manecillas del reloj se puede observar: 1) las endomicorrizas con vesículas y arbusculos, 2) las endomicorrizas de las orquídeas que forman ovillos en las células, 3) en las raíces de los brezos, helianteros, etc.; 4) las ectendomicorrizas, caracterizadas por un manto y la penetración de las hifas a las células. (Tomado de Le Tacon, 1965)

Durante su desarrollo y madurez son separados del citoplasma hospedante por material de apariencia similar al de la pared celular vegetal; al formarse aumenta notoriamente el volumen citoplasmático, desaparecen los gránulos de almidón, el núcleo aumenta de tamaño, en la cercanía de las ramas arbusculares pueden detectarse abundantes mitocondrias, retículo endoplásmico y proplástidos (Guzmán y Ferrera, 1990) La formación de arbuscúlos incrementa la actividad metabólica de la célula del hospedero, la cual es principalmente debida a la transferencia bidireccional de metabolitos y nutrimentos desde y para el hongo. Los arbuscúlos viven solo de 4 a 15 días. Ellos degeneran y son digeridos por la célula del hospedero. Después de que los arbuscúlos declinan las células de la planta se restablecen a su función normal (Sieverding, 1991).

Las vesículas son henchimientos apicales de la hifa; ellas contienen lípidos y son órganos de reserva del hongo. Durante situaciones de estrés (bajo suministro de metabolitos desde la planta hospedera) estas reservas son utilizadas por el hongo y entonces las vesículas degeneran (Sieverding, 1991). Pueden formarse inter o intracelularmente. En su juventud contienen citoplasma homogéneo y su pared es delgada y estratificada, con su maduración los materiales lipídicos coalescen gradualmente y el protoplasma se torna denso (Guzmán y Ferrera, 1990).

El diámetro de las esporas depende de las especies del hongo y pueden medir de 15-800  $\mu\text{m}$ , su forma puede ser globosa, elíptica, ovoide, reniforme, claviforme o irregular. Algunas especies de hongos MVA (géneros *Acaulospora*, *Glomus* además de todas las especies de *Sclerocystis*) son esporocápicos (Sieverding, 1991).

#### Desarrollo de la infección MVA

Las esporas inactivas e hifas del hongo en el suelo o fragmentos de raíz con estructuras de hongos son fuentes (propágulos infectivos) que pueden empezar el desarrollo de la infección de la micorriza Vesículo-Arbuscular, la que se lleva a cabo en seis fases (Sieverding, 1991)

- a) La Preinfección. Ocorre la germinación de esporas y el crecimiento primario del tubo germinativo. Los núcleos (las esporas contienen de 2000 a 3000 núcleos) son distribuidos nuevamente y formados en estructuras de germinación. Cuando los tubos germinativos no están en contacto con una raíz de un hospedero potencial, la infección potencial del propágulo del hongo germinado es perdido dentro de un período que va de pocos días a varias semanas.
- b) Infección primaria (penetración a la raíz): Normalmente el hongo penetra a la raíz entre las células epidermales y forma frecuentemente un apresorio en la primera capa de células. Después este estado de crecimiento autótrofo del hongo termina.
- c) Formación de arbuscúlos y vesículas. Después de la penetración a la raíz, la hifa crece inter e intracelularmente. El crecimiento del hongo es restringido a la epidermis; no son colonizadas: endodermis, xilema y floema, tejido meristemático

y partes clorofílicas de la planta. Los arbuscúlos son frecuentemente formados dentro de las células poco después de la penetración (2-5 días). Los procesos de formación y degeneración de arbuscúlos ocurren simultáneamente en la raíz; frecuentemente todos los estados de los arbuscúlos son observados en la raíz. Al poco tiempo de formación de los arbuscúlos, algunos hongos MVA forman vesículas inter y/o intracelularmente. Las especies de hongos pertenecientes a los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* nunca forman vesículas, algunas otras especies sí, pero solo raramente.

- d) Extensión del hongo en la raíz y en la rizósfera. La extensión de la infección en la raíz está dividida en tres fases: 1) la fase inicial (fase larga) durante la cual la infección primaria tiene lugar, 2) la fase exponencial durante la cual el hongo se expande y crece rápidamente en la raíz, 3) la fase en reposo durante la cual la raíz y el hongo continúan creciendo a la misma velocidad. La planta, la especie de hongo y especialmente las condiciones físicas y químicas del suelo (además del resultado de los porcentajes de captación de nutrientes por la planta) influyen la duración de la fase larga de la infección, ésta continúa durante la fase de reposo. Durante la fase exponencial el hongo crece inter o intracelularmente, especialmente en raíces secundarias finas el desarrollo de la infección en el sistema radical tiene lugar también con hifas sobre la superficie de la raíz. La hifa sigue creciendo y penetrando la raíz una y otra vez a distancias irregulares. Los arbuscúlos y vesículas son continuamente formados y degradados durante las fases exponencial y de reposo de la infección.
- e) Extensión del hongo en el suelo: Después de la infección primaria y durante la fase de extensión de la infección en la raíz, la hifa crece fuera de la raíz y en la

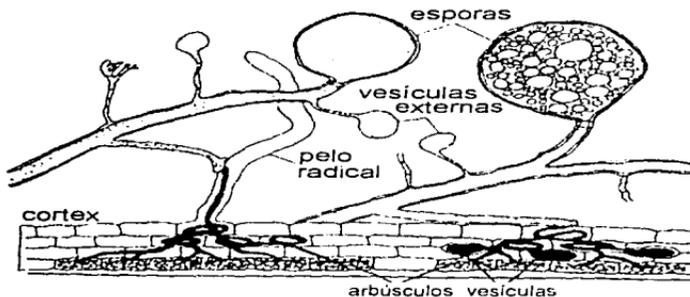


Figura 2. Infección micorrizal.  
(Tomado de Richards, 1987)

rizósfera. En general, el joven micelio externo de la raíz no está septado y consiste de bastas ramificaciones dicotómicas, hifa principal de 5-20  $\mu\text{m}$  de diámetro, la hifa secundaria 1-5  $\mu\text{m}$  de diámetro, su crecimiento está influenciado por factores abióticos y bióticos del suelo.

- f) Estructuras reproductivas del hongo MVA: El hongo MVA forma esporas sobre el micelio externo. La formación de esporas puede comenzar muy pronto, de 3-4 semanas después de infectada la raíz, con algunas especies de hongos mientras otras requieren de 6 meses después de iniciada la esporulación. Las especies de hongos, la planta hospedera y las condiciones ambientales del suelo afectan el tiempo y grado de esporulación. La esporulación de los hongos es un proceso dinámico algunas esporas son formadas y otras germinan al mismo tiempo. El micelio del hongo dentro y fuera de la raíz es otra estructura reproductiva del hongo MVA. Estas pueden germinar e infectar nuevas raíces. Mientras las esporas pueden sobrevivir por varios años en el suelo, la infectividad del micelio del hongo (aislado de la planta hospedera o después de muerto el hospedero) dura sólo de 2-4 semanas (Sieverding, 1991)

#### Factores que intervienen en la colonización del hongo MVA

La magnitud del beneficio de la micorrización puede ser modificada por factores inherentes a la planta, hongo, suelo, condiciones ambientales, acción de otros organismos, manejo y a las interacciones de todos ellos

##### *a) Factores inherentes a la planta hospedera.*

Las características morfológicas y fisiológicas de una planta dada pueden ser los principales determinantes de la dependencia de la condición micorrizada para crecer y reproducirse. Las diferencias en la respuesta a la micorrización al igual que las variaciones en los requerimientos nutricionales entre las plantas de diferente especie, cultivadas en las mismas condiciones, son bien conocidas. A nivel de una misma especie, las variaciones entre genotipos son un factor clave en la dependencia micorrizica. (Guzmán y Ferrera, 1990).

El grado de dependencia micorrizica está generalmente relacionado con las características del sistema radical, entre mayor sea la capacidad de producción de los pelos radicales y de raíces por una planta dada, mayor será su independencia de los endófitos fúngicos para crecer y reproducirse. (St John, 1980). Las diferencias en dependencia micorrizica entre genotipos de una misma especie se asocian también con variaciones en las características radicales.

Se ha reportado que el efecto de la colonización micorrizica puede variar con la etapa fenológica de la planta. La mayor dependencia en estado de la plántula de algunas especies puede ser debida a su menor cantidad de tejidos de

almacenamiento y menor desarrollo radical con relación al total de biomasa producida, (Guzmán y Ferrera, 1990).

Fyson y Oaks (1992) trabajando con algunas fitohormonas del maíz encontraron que los niveles del ácido abscísico (ABA) eran considerablemente más altos en plantas infectadas que en las que no lo estaban. En contraste, la cantidad de citoquinina fue la misma tanto en malcos micorrizados como en los que no estaban infectados, igualmente ocurrió con el ácido indol-acético (AIA). Es por esto que se consideró que el ABA puede ser un factor que afecta la colonización por el hongo.

*b) Factores inherentes al endófito*

Menge (1983) separó en dos grupos a los factores que gobiernan la eficiencia: los intrínsecos al hongo y los relacionados con el potencial inoculante. En el primer grupo incluyó la habilidad del hongo para dispersarse en la raíz de un hospedero dado, su velocidad de crecimiento, su capacidad para formar arbuscúlos y la longevidad de éstos, la cantidad de hifas externas, su eficiencia de absorción y transferencia de fósforo y sus requerimientos de compuestos carbonados; en el segundo grupo incluyó a las características de las esporas (germinación, madurez y dormancia), el tipo (hifas, esporas, vesículas, materia orgánica base), la densidad, localización y el potencial del inóculo y el efecto de la velocidad de crecimiento de la raíz, los exudados radicales, las interacciones con otros microorganismos y los factores físicos y químicos propios del suelo.

La cantidad de inóculo tiene efectos sobre el nivel de colonización micorrízica y la producción de materia seca por la planta. La cantidad de inoculante puede afectar la dispersión, la rapidez y la intensidad de la infección, lo que influye positivamente en la efectividad de la simbiosis.

Los hongos endomicorrízicos presentan diferencias en su tolerancia a determinado pH del suelo; el cambio en esta característica edáfica puede inducir modificaciones en la respuesta a la micorrización, (Guzmán y Ferrera, 1990)

*c) Efectos del suelo, el enclado y la fertilización.*

Las diferencias en adaptación de hospedero y hongo a condiciones edáficas específicas pueden modificar el tipo de respuesta con el cambio de un suelo a otro. El contenido de fósforo asimilable, la habilidad fijadora, el pH, el contenido de otros nutrimentos o de elementos tóxicos ejerce influencia directa sobre los componentes de la simbiosis.

Los valores extremos de pH afectan la solubilidad del fósforo (y de otros elementos), por lo que la inhabilidad de ciertas plantas no micorrizadas para absorber este nutrimento cuando su disponibilidad es baja, puede ser la principal causa de detención del crecimiento, más que el efecto directo de la acidez o alcalinidad sobre el sistema radical. Además del genotipo del hospedante, el

contenido inicial de fósforo de un suelo dado es un factor determinante de la respuesta a la micorrización, (Guzmán y Ferrera, 1990).

Uno de los beneficios esperados de la simbiosis micorrízica es la mejor utilización del fósforo aplicado en un ciclo dado, por esto es importante realizar investigaciones en ese sentido, que nos permitan conocer la naturaleza de las interacciones entre la forma de inoculación, de aplicación de fertilizante, el manejo del suelo y las posibles variaciones con el cambio en los genotipos de hongo y hospedero y el patrón de cultivo, el cual tiene efectos en la colonización micorrízica y en el rendimiento, (Sieverding y Leihner, 1984).

La adición de formas ligeramente solubles de fósforo como fertilizante en suelos ácidos puede ser una alternativa idónea para mantener un suministro constante de ese elemento sin que ocurra disminución drástica en los niveles de colonización y dispersión de los hongos micorrízicos en el suelo, comúnmente observables con la adición de formas solubles o con el aumento en la cantidad de fósforo asimilable, (Guzmán y Ferrera, 1990) La adición de fertilizantes no fosforados puede afectar también a la simbiosis. Se ha reportado que la aplicación de nitrógeno al suelo llega a tener efectos deletéreos sobre la colonización micorrízica, la nodulación y actividad de la nitrogenasa y el crecimiento de *Trifolium subterraneum* (Chambers *et al.*, 1980) La fertilización con azufre puede disminuir el contenido de carbohidratos solubles en el sistema radical, el porcentaje de longitud de raíz micorrizada y el peso radical de *Trifolium subterraneum*, (Thompson *et al.*, 1985).

#### *d) Influencia de los factores ambientales.*

La simbiosis endomicorrízica también es afectada por diversos factores ambientales. Por ejemplo, la cantidad y la calidad de luz es decisiva en el nivel de respuesta de una planta dada. El contenido de humedad edáfica es determinante en la respuesta a la micorrización, tanto por efectos en el desarrollo radical como por el aumento en la disponibilidad de fósforo en la solución del suelo, (Fitter, 1985).

La adición de herbicidas como el Cloroprofam, Sulfato y Fenmedifan, inhibidores de la fotosíntesis, disminuyen la colonización afectando el metabolismo de carbono del hongo, aunque la condición micorrizada puede ayudar a la planta a recuperarse de los efectos de estos productos.

La presencia en el suelo o la aplicación de agua contaminada con metales pesados puede afectar el crecimiento vegetal por sus efectos en la colonización micorrízica, especialmente cuando el pH es bajo, (Guzmán y Ferrera, 1990).

#### *e) Papel de la biota no micorrízica del suelo.*

La actividad de otros microorganismos en la rizósfera afecta decisivamente el comportamiento de la simbiosis endomicorrízica. Se ha demostrado cierta influencia selectiva sobre poblaciones de bacterias y actinomicetes en la rizósfera o rizopiano,

indicando esto que las raíces micorrizadas difieren cualitativamente, en su composición microbiana, de las no micorrizadas. Los efectos pueden estar más relacionados con la acción de otros organismos frecuentemente asociados; por ejemplo, se ha reportado que los sobrenadantes de fosfobacterias o de *Rhizobium* sp. libres de células bacterianas, mejoran el crecimiento, la nodulación y la formación de micorriza. (Azcón y Barea, 1980)

Se ha reportado la existencia de bacterias capaces de usar pirofosfatos como fuente de energía en las cavidades de lumen de esporas micorrizicas producidas en la rizósfera de *Cicor unctinum* (Varma *et al.*, (1985), citado en Guzmán y Ferrera, 1990).

#### Función de MVA

Bajo condiciones de campo casi todas las plantas están infectadas por el hongo MVA, pero es difícil de mostrar la función de este en campo

##### *a) Demanda de carbohidratos para MVA*

La simbiosis entre plantas y hongos MVA es mutualista y necesaria para la sobrevivencia del hongo. El hongo recibe productos de la fotosíntesis de la planta. La extensión de los requerimientos del hongo no ha sido investigada. Parece que el flujo de carbohidratos está regulado por las especies de plantas hospederas y depende de las especies de hongos MVA. Se estima que el hongo MVA requiere de 1-17% de carbohidratos los cuales permiten a la planta la producción de biomasa en la raíz, para su actividad funcional y desarrollo. El máximo hipotético del requerimiento de productos de la fotosíntesis puede ser alto de 40-60% para la extensiva demanda de carbohidratos en los límites de los hongos en la producción de biomasa de la planta (Stribley *et al.*, 1980). No es posible que estos altos porcentajes sean comunes. Se conoce que la depresión en el crecimiento se debe a la asociación MVA (Buwalda y Goh, 1982). Adicionalmente el hongo MVA necesita carbohidratos para la producción de esporas: la materia seca de esporas en campo puede variar de 10-1000 Kg/Ha. La demanda del hongo MVA por elementos nutritivos tales como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio es baja (Sieverding *et al.*, 1989).

Los productos de la fotosíntesis de la planta (aparentemente metabolitos no específicos) son absorbidos por el hongo MVA en la raíz, especialmente por arbuscúlos donde la superficie de contacto entre el hongo y la planta hospedera es muy grande. Aún no es posible la identificación de los mecanismos fisiológicos del movimiento de los carbohidratos de la planta hospedera al hongo (Sieverding, 1991).

##### *b) Incremento de la rizósfera por MVA.*

Al mismo tiempo que MVA es formado en las raíces, desarrolla un micelio alrededor de las mismas. Las hifas externas e internas del hongo penetran hasta diez veces por centímetro de la raíz. Los puntos de conexión pueden ser mucho más

numerosos bajo condiciones naturales. El micelio externo puede crecer con un radio considerable en el suelo (se ha observado a una distancia de 8 cm desde la raíz, pero también se espera a mayores extensiones). Aún no hay información disponible sobre la densidad de micelio externo al incremento de la distancia hacia la raíz; métodos indirectos de investigación sugieren que la densidad de micelio es superior a 2 cm a partir de la raíz. Es probable que la densidad del micelio y su crecimiento o extensión en el suelo dependan altamente de las especies de hongo (Abbott y Robson, 1985) y sean afectadas por la planta y factores del suelo. Orozco *et al.* (1986) encontró de 5-39 m de hifa de hongo MVA por mililitro de una solución de suelo orgánico de bosques templados.

A través del micelio externo, el contacto de la raíz con el medio en el cual crece se incrementa considerablemente. Calculando que 1 cm de raíz sin micorriza puede explorar alrededor de 1-2 cm<sup>3</sup> de volumen del suelo (con ayuda de los pelos radicales), este volumen se incrementa potencialmente a 5-200 veces por micelio externo de MVA en la raíz, asumiendo el crecimiento radial de la hifa MVA alrededor de la raíz. El volumen del suelo de la rizósfera es incrementado en 200 cm<sup>3</sup> por cm de raíz infectada, comúnmente se ha observado de 12-15 cm<sup>3</sup> por cm de raíz infectada (Sieverding, 1991).

Además, el micelio del hongo MVA parece ser más resistente que la raíz misma, a situaciones abióticas de estrés tales como, sequía, elementos tóxicos y suelos ácidos. El tiempo de vida del micelio externo no es conocido, pero el porcentaje de micelio externo parece declinar rápidamente de 3-4 semanas después de la primera infección de la planta (Schubert *et al.*, 1987).

#### *c) Función de MVA en la captación de nutrimentos de la planta.*

La captación de nutrimentos de la planta está principalmente determinada por la capacidad de absorción de elementos de la raíz, difusión de nutrimentos y subsecuentemente por la liberación de elementos en la solución del suelo. Los porcentajes de absorción de iones con alta movilidad, por ejemplo, nitratos (NO<sub>2</sub>), depende de la solución del suelo y cultivo específico o especie de planta. La capacidad de captación de iones con baja velocidad de difusión, por ejemplo, fósforo, zinc, y molibdeno y en menor grado potasio, azufre, y amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), depende de la densidad por volumen del suelo de la raíz. En este caso la morfología de la raíz y el micelio externo del hongo MVA determina los porcentajes de captación de elementos por la planta. La principal función de la micorriza es incrementar el volumen del suelo explorado para la captación de nutrimentos, así como aumentar la eficiencia de absorción de los mismos desde la solución del suelo. Frecuentemente se menciona los beneficios de MVA por incorporación de metabolitos del hongo en los procesos de digestión y degeneración de las estructuras del hongo MVA en las células de la raíz. En efecto, sólo el 1% del total de beneficios de MVA participan en la nutrición de la planta (Sieverding, 1991).

*d) Fosfonutrición.*

El hongo MVA tiene un gran significado en el crecimiento de las plantas cuando se presentan pocos fosfatos en el suelo. La concentración de fósforo es muy baja en la solución del suelo de origen volcánico, los iones de este se agotan rápidamente del suelo de alrededor de las raíces, a unos cuantos milímetros de distancia. Debido a la difusión extremadamente lenta de sus porcentajes, éstas zonas no pueden restaurarlo rápidamente. El crecimiento del micelio MVA va más allá de esta zona e incrementa el volumen del suelo que es explorado para la captación de fósforo. Aunque los mecanismos de absorción y extracción de fósforo por las hifas del hongo no son conocidos, la captación debe efectuarse ya que las concentraciones de este son más bajas en la solución del suelo que en las hifas del hongo. Este elemento se absorbe como ortofosfato y se transporta activamente a través de la hifa como polifosfato. La translocación de fósforo de la hifa a la raíz se ha calculado con una velocidad de  $1.2 \times 10^{-3}$  mol/cm<sup>2</sup> de raíz por segundo. La mejor transferencia de fósforo del hongo a la planta ocurre en las células de la raíz que contienen arbusculos; sin embargo, también las hifas internas de la raíz pueden liberarlo a la planta hospedera. Generalmente, la transferencia de fósforo del hongo al hospedero se realiza durante procesos de intercambio del hospedero al hongo (metabolitos compuestos de carbono). La planta hospedera parece controlar el desarrollo y actividad del hongo mediante la regulación de carbohidratos moviéndose hacia el hongo (Sieverding, 1991).

Se sabe que el hongo MVA extrae iones de fósforo de las mismas fuentes de fosfatos en la solución del suelo, las cuales son también absorbidas por raíces sin micorriza. La fertilización con fósforo, las condiciones químicas del suelo y los procesos microbiológicos influyen en la cantidad de este elemento de las fuentes disponibles. Es probable que, indirectamente, la asociación MVA afecte los procesos de fijación y solubilización del nutrimento, además de la mineralización de la materia orgánica a través de efectos indirectos sobre los microorganismos.

Aún se desconoce si son o no los mecanismos de la asociación MVA los que pueden, indirectamente mejorar la solubilización de fósforo insoluble, por ejemplo, incrementando la exudación de la raíz (Sieverding y Galvez, 1988). Es conocido que las plantas micorrizadas pueden usar más eficientemente las rocas de fosfatos insolubles que las plantas sin micorriza. En suelos ácidos (pH < 5.3) las rocas fosfatadas son constantemente solubilizadas y a velocidad relativamente alta, mientras que las fuentes de fósforo soluble en agua pueden ser fijadas en complejos insolubles de aluminio y hierro. A intervalos de pH entre 5.5 y 6.5 la solubilización de rocas fosfatadas, especialmente apatitas, puede ser relacionada a la fuerte acidificación de la rizósfera debido a la fisiología y captación de nutrimentos por la raíz (Nye y Kirk, 1987). Aunque esto es hasta ahora desconocido, se sabe que las hifas del hongo MVA juegan un papel importante en la acidificación de la rizósfera (Sieverding, 1991).

#### *e) Absorción de nitrógeno.*

Hay evidencia de que el nitrógeno es tomado por la hifa MVA desde fuentes inorgánicas de amonio. El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), a través de difusión, es bastante móvil en el suelo. No se conoce un efecto directo de MVA sobre la captación de  $\text{NO}_3^-$  (Sieverding y Toro, 1988)

#### *f) Reciclaje de nutrimentos.*

Las esporas del hongo MVA son sólo fuentes menores de nutrimentos en ecosistemas naturales. Los nutrimentos en esporas de hongos pueden ascender a 10-60 g N/Ha, 1-30 g P/Ha, 1-18 g K/Ha, 4-50 g Ca/Ha y 1-10 g Mg/Ha. El cambio en los porcentajes de esporas de hongos MVA puede ser bastante lento, ya que ellas son inactivas. Sin embargo, la biomasa del micelio del hongo puede ser muy alta en algunos suelos. Cuarenta y dos metros de hifa MVA equivalen a 1mg de materia fungica seca (Herrera *et al.*, 1986). Asumiendo que la hifa MVA tiene concentraciones de nutrimentos similares a las esporas MVA (17 mg N/g, 2.67 mg P/g, 0.88 mg K/g, 3.97 mg Ca/g y 0.91 mg Mg/g de materia seca de esporas, promedio de cinco diferentes especies de hongo) los nutrimentos en el micelio del hongo podrían ser iguales a 4-32 Kg N/Ha, 0.6-5 Kg P/Ha, 0.2-1.7 Kg K/Ha, 1-7.5 Kg Ca/Ha y 0.2-1.7 Kg Mg/Ha. Este cálculo se asume a que todos los micelios de hongo contienen citoplasma, lo cual puede no ser el caso bajo condiciones naturales. Se espera que el cambio en los contenidos de las hifas del hongo fueran más altos que en esporas MVA. Sin embargo, no se conoce si estos nutrimentos del hongo son de relevancia para los cultivos (Sieverding *et al.*, 1989). El hongo MVA puede jugar un importante papel como transportador de nutrimentos en el proceso cíclico de los mismos. A través de la intensiva exploración del volumen del suelo por el micelio externo de la raíz, MVA puede extraer intensiva y eficientemente, nutrimentos solubles del suelo, así, solubilizando o mineralizando los nutrimentos, evita la fijación química o lixiviación. La función del hongo MVA está concentrada en el horizonte más alto del suelo, donde se encuentra la materia orgánica y donde ocurre el mayor crecimiento de la raíz. Se han encontrado muy bajas densidades del hongo MVA en horizontes profundos del suelo, así, ellos no parecen tener significancia en el reciclaje de nutrimentos del suelo (Sieverding, 1991).

#### *g) Función bajo condiciones adversas del suelo.*

Hay muy poca información sobre la función de MVA en el crecimiento de las plantas bajo condiciones físicas adversas del suelo; esto es especialmente relacionado a la textura y compactación del suelo. Se sabe que existen hongos MVA en suelos extremadamente arenosos; la infección MVA a las raíces y el número de esporas puede ser muy alto en estos (Cortés, 1986). Por otro lado, la buena aireación del suelo es prerequisite para el óptimo desarrollo y actividad fisiológica de la asociación MVA.

Las condiciones químicas adversas del suelo, las cuales limitan la producción de los cultivos en los trópicos, son: pH extremadamente bajo, alcalinidad, salinidad y

altas concentraciones de elementos tóxicos, tales como aluminio, fierro y manganeso. En general, dentro de un suelo químicamente adverso se combinan varios factores que afectan negativamente el crecimiento de las plantas, por ejemplo, bajo pH combinado con la toxicidad de aluminio, fierro y manganeso, y la deficiencia de fósforo debida a la fijación en complejos de aluminio y fierro, la alcalinidad puede estar relacionada con el desbalance en la disponibilidad de calcio y magnesio, generalmente, también se relaciona con la deficiencia de fósforo, debida a la fijación en forma de apatitas. En adición a los efectos tóxicos del sodio, la salinidad causa baja disponibilidad de agua. MVA puede ser importante bajo estas condiciones ya que las plantas micorrizadas toleran las adversidades debida a la mayor nutrición con fósforo y otros macro y micronutrientes. Sin embargo, no hay evidencia de que el hongo MVA mejore directamente la tolerancia de las plantas a condiciones químicas adversas (Sieverding, 1991).

#### *h) Función en la agregación del suelo.*

Los suelos fértiles tienen un alto porcentaje de agregados estables. El hongo MVA puede unir y agregar partículas de suelo a través del intensivo crecimiento del micelio. Sutton y Sheppard (1976) mostraron que las plantas micorrizadas que crecieron en arenales agregaron cinco veces más arena que las plantas con raíces de igual biomasa, pero sin asociación micorrizica. La formación de agregados puede ser importante para mejorar las condiciones físicas del suelo. Adicionalmente, la aireación del suelo por el hongo MVA es un control potencial en la erosión del suelo. El micelio MVA no solo agrega partículas libres del suelo, las hifas son atadas a ellas a través de polisacáridos amorfos (Burns y Davies, 1986).

#### *i) Función en situaciones de estrés climático*

Cuando la temperatura del suelo asciende a niveles tan altos, el desarrollo de MVA y producción de las plantas son marcadamente reducidos. Por otro lado, no es usual encontrar estas temperaturas en zonas del suelo a profundidades mayores a 5 cm, por lo tanto no se puede afectar la micorriza aquí. Las temperaturas menores de 17-18 °C (terrenos montañosos), pueden ser más problemáticos ya que reducen la efectividad del hongo MVA (Sieverding y Toro, 1988).

Algunas funciones benéficas de MVA en relación al agua de las plantas son: menor resistencia a la conductividad hidráulica, efectos positivos sobre la regulación de fitohormonas y estomas, y mayor ramificación en el sistema radical. Parece que la relación planta micorrizada-agua se incrementa indirectamente al mejorar la nutrición, especialmente de fósforo, de la planta. También puede aumentar la captación de potasio, elemento conocido por su papel fundamental en la regulación del agua en las plantas. No hay evidencia de que el agua sea transportada por la hifa del hongo MVA, por tanto, es improbable que el hongo MVA pueda poner agua directamente a disposición de la planta. Por otro lado, al máximo de la transpiración el diámetro de la raíz se encoge y la película de agua de alrededor de ésta se rompe; esto sugiere que la hifa del hongo MVA puede funcionar como puente físico y que puede mantener el contacto entre la raíz y el agua del suelo; de esta manera se

preserva la película de agua (y fluyendo hacia la raíz) y la transpiración (Sieverding, 1991).

Con la asociación MVA las plantas crecen más rápido, y a través de un profundo sistema radical pueden extraer agua más fácilmente. También se incrementa considerablemente el uso y eficiencia del agua, es decir la producción de materia seca por unidad de agua disponible. Hay evidencia de que las plantas micorrizadas se recuperan más rápido, después de un periodo corto de estrés hídrico, que las plantas no micorrizadas. La disponibilidad y difusión de elementos nutrimentales disminuye durante la sequía. Parece que bajo estas condiciones la hifa del hongo MVA es más resistente que las raíces de las plantas. Posteriormente con las lluvias se presentan otra vez los nutrimentos en la solución del suelo, pudiendo ser tomadas por el micelio funcional del hongo. Otra función importante del hongo MVA es que, debido al rápido e incrementado crecimiento, las plantas pueden hacer mejor uso de los periodos cortos (2-3 meses) en los que las condiciones climáticas son óptimas (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995).

### Prácticas de fertilización

#### *Fuentes de fósforo*

Las fuentes de fósforo afectan los niveles de infección del hongo MVA. El fósforo soluble en agua, por ejemplo los superfosfatos, tiene efectos negativos y las rocas fosfatadas tienen efectos positivos. En general, la aplicación de éste incrementa la infección en la raíz. Las fuentes de fósforo en sitios específicos parecen tener efectos sobre la producción de esporas de MVA.

#### *Fertilización con nitrógeno.*

El nitrógeno es el fertilizante más frecuentemente aplicado en los cultivos, el principal y único elemento añadido al suelo. La urea (el fertilizante nitrogenado más comúnmente usado) en el suelo se convierte en amonio. El incremento a los niveles de fertilización de nitrógeno puede inhibir la formación de MVA y afectar negativamente la población del hongo. Inhiben más las fuentes de amonio que las de nitratos. De cualquier modo, los efectos de la aplicación de éste sobre MVA no son constantes. Ellas pueden variar de un sitio del suelo a otro y pueden depender de la disponibilidad de fósforo (Sieverding, 1991).

#### *Composta.*

Se han observado efectos positivos de la composta sobre la aireación del suelo, lo que mejora la raíz y desarrollo de MVA. También se han reportado efectos negativos de los fertilizantes químicos sobre el desarrollo de MVA.

Las raíces son intensamente colonizadas por el hongo MVA cuando se aplica composta. En contraste a la aplicación de cal, la corrección por composta no altera

la diversidad de las especies de hongo MVA en el suelo, ni afecta la composición relativa de esporas MVA de la comunidad fúngica (Sieverding, 1991). Se ha confirmado que la calidad de la composta es importante para la formación óptima de MVA. Hay poca información acerca de los efectos específicos de fertilizantes orgánicos sobre las asociaciones MVA y sus dinámicas de población.

#### *Efectos del encalado*

Se recomienda y necesita el encalado en suelos ácidos para reducir la saturación por Al debajo de los niveles tóxicos para ciertos cultivos y suministrar calcio y magnesio al suelo. Frecuentemente, se requieren solo aplicaciones pequeñas de cal (Sánchez y Salinas, 1981).

Los encalados de 0.5-4 ton/Ha, con cal dolomítica o calcítica, incrementan los porcentajes de infección en la raíz. En contraste, la densidad de esporas del hongo MVA disminuye significativamente debido al incremento en las aplicaciones de cal. Algunas especies de hongo MVA pueden ser sensibles al encalado. Las investigaciones en campo son deficientes a cerca de los efectos del encalado sobre las poblaciones nativas de MVA (Saif, 1986)

#### Respuestas del cultivo a la inoculación

Sieverding (1991) menciona que para obtener respuestas favorables en las cosechas a través de la inoculación, se requiere que:

- 1) El inóculo contenga hongos MVA preseleccionados y altamente efectivos.
- 2) Se aplique bastante inóculo para obtener una distribución espacial, si es posible, una mitad bajo el sustrato de plantación y la otra mitad a los lados, a lo largo de los surcos. Este es el método más eficiente, si el inóculo se aplica solo bajo las plantas, puede ser necesario repetir la inoculación para el siguiente año.
- 3) En suelos ácidos, con bajo contenido de fósforo, la inoculación sea combinada con la fosforización (son convenientes 50 Kg P/Ha de roca fosfatada).
- 4) Nitrógeno y potasio sean aplicados en tales cantidades que, la extracción de estos por la planta sea remplazada por la fertilización del suelo.

#### Importancia del fósforo en la planta

En la planta madura, el fósforo se presenta en gran proporción sobre todo en las semillas y el fruto. Este elemento es abundante en las células meristemáticas y es componente de la lecitina y de los ácidos nucleicos, durante la maduración de las semillas, las plantas toman grandes cantidades de fósforo.

El fósforo es necesario para ciertos procesos enzimáticos, como la producción del alcohol a partir de azúcares, y las transformaciones de azúcares en almidón y viceversa. (Miller, 1981).

Ortiz y Ortiz (1980) numeran las funciones del fósforo en la planta como sigue:

1. Es constituyente del ácido nucleico, la fitina y los fosfolípidos. Un abastecimiento adecuado de fósforo en el período del desarrollo inicial de la planta es importante en la formación de la primordia para las partes reproductivas de las plantas.
2. Estimula el desarrollo radicular inicial ayudando así en el establecimiento rápido de las plántulas.
3. Origina un comienzo rápido y vigoroso de las plantas.
4. Produce la madurez temprana de los cultivos, particularmente en los cereales.
5. Estimula la floración y ayuda en la formación de la semilla.
6. Aumenta la relación de grano a paja rastrojo
7. Mejora la calidad alimenticia de los granos y de otras cosechas.

## *Azospirillum*

En 1978 Tarrand y sus colaboradores propusieron a *Azospirillum* como género con base en diferencias morfológicas y fisiológicas en experimentos sobre homología de ADN distinguiendo dos especies *A. brasilense* y *A. lipoferum*. Se han descrito tres especies más: *A. amazonense* aislada de pastos del Amazonas en Brasil; *A. halopraeferans*, la especie halo-tolerante asociada al pasto Kallar y *A. irakense*, degradadora de pectina encontrada en raíces de arroz. Sin embargo son más importantes las dos primeras (Bashan y Levanony, 1990).

### Características de *Azospirillum*

Son células con diámetro de 1.0-3.5  $\mu\text{m}$ , presentan, generalmente, una distribución flagelar monotrica. Algunas cepas forman una película en el fondo del medio en el que se cultivan, la cual posteriormente se dispersa. Microscópicamente se observa como bastones Gram (-) de forma espiral y móvil. Las colonias son rosas o rojas (Ortega, 1989)

El organismo comienza a crecer desde el punto de inoculación hacia abajo, en forma de un velo delgado o balón redondo. Al segundo día cuando la demanda de oxígeno es más alta, la película se establece de 1-2 a 2-4 mm abajo de la superficie y llega a convertirse en ondulada, blanca muy densa y fina.

Cuando el pH del medio cambia a alcalino, la película no se desplaza, sino permanece a aproximadamente 3 mm abajo de la superficie y se dispersa. En cambio cuando se sustituye el malato por sacarosa, la película formada inicialmente migra a la superficie y después de 4-5 días se hace más gruesa, debido a que el pH del medio cambia poco. Las colonias son pequeñas, arrugadas, blancas, planas-lisas, con bordes elevados (Ortega, 1989).

Su crecimiento se realiza únicamente bajo condiciones aeróbicas, desarrollando colonias pequeñas, secas, blancas-rosadas, con centros color azul-verdoso, elevadas, redondas o de densidad irregular.

### Biogéimica y fisiología de *Azospirillum*

#### *Metabolismo del carbono*

*Azospirillum sp.* posee un metabolismo de tipo respiratorio principalmente, es decir, obtiene la mayor parte de su energía de la oxidación de los combustibles orgánicos por el oxígeno molecular, el cual actúa como aceptor electrónico final.

Bajo condiciones total o parcialmente anaeróbicas, estos organismos presentan cierta capacidad fermentativa, es decir, pueden utilizar el nitrato ( $\text{NO}_3$ ) aceptor electrónico final en vez del oxígeno, permitiendo la síntesis de suficiente ATP para la reducción del nitrógeno (Bashan y Levanony, 1990).

#### *Metabolismo de nitrógeno.*

*Azospirillum* utiliza una amplia variedad de fuentes de nitrógeno ( $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , extracto de levadura, casaminoácidos y peptona), ya que parece tener capacidad para participar en varios procesos de transformación del nitrógeno en la naturaleza. Fue el primer microorganismo que se reportó con capacidad para realizar, tanto la fijación del nitrógeno como la desasimilación del  $\text{NO}_3$  a gas (desnitrificación).

Los procesos de transformación de nitrógeno en la naturaleza en los cuales participa *Azospirillum* son:

- 1) Los procesos de fijación de nitrógeno en las raíces y suelo, con sustratos de carbono, proporcionados por la fotosíntesis de la planta o descomposición de la materia orgánica.
- 2) Reducción desasimilatoria de  $\text{NO}_3$  a  $\text{NO}_2$
- 3) Desnitrificación de  $\text{NO}_3^-$ , liberado en el suelo o adicionado como fertilizante, con consecuente pérdida de gas
- 4) Síntesis de materia orgánica

#### Colonización radicular por *Azospirillum*

*Azospirillum* puede colonizar la parte interna o externa de la raíz. En ésta última las bacterias tienden a formar pequeños agregados, aunque es posible encontrar también células aisladas distribuidas a lo largo de la superficie radicular. Por otro lado, las bacterias colonizadoras de la parte externa de la raíz se encuentran embebidas en la capa mucilaginosa que cubre la superficie radicular. Tanto raíces vivas como muertas pueden ser colonizadas. En el proceso de colonización interna, las células de *Azospirillum* pueden invadir las raíces penetrando a través de los espacios intercelulares (Andreeva *et al.*, 1991).

En cereales, la colonización ocurre principalmente en las zonas de elongación de la raíz y de los pelos radiculares (Zamudio y Bastarrachea, 1994).

Se desconoce el mecanismo de penetración de *Azospirillum* a los espacios intercelulares. Las diversas teorías, propuestas hasta ahora, son: a) invasión bacteriana vía tejidos corticales distribuidos donde ramificaciones de raíces laterales emergen a partir de raíces principales, b) invasión a través de pelos radiculares lisados y heridas mecánicas ocasionadas durante el crecimiento de la planta, y c) penetración directa a través de lamelas intermedias seguidas de degradación de la pectina una vez que la bacteria logra penetrar por hendiduras de la zona cubierta por epidermis donde emerge la raíz lateral (Bashan *et al.*, 1996).

Se han identificado dos fases en el mecanismo de adhesión de *Azospirillum*. La primera fase del proceso de adhesión de *Azospirillum* consiste en una adhesión rápida y débil dependiente de proteínas superficiales bacterianas; al enjuagar las raíces con agua agitándolas suavemente, la mayoría de las bacterias se pueden liberar. La mayoría de las áreas corticales son saturadas en un período de dos horas después de la inoculación, encontrándose variación dependiendo de la fase de crecimiento bacteriana y de la cepa utilizada. El segundo paso (llamado "Anclaje") bajo condiciones *in vitro* es independiente del primero y consiste en un anclaje firme, caracterizado por la producción de fibrillas largas, formando una red que conecta las células de *Azospirillum* entre sí y a la superficie radicular de las plantas (Bashan y Holguin, 1993) e involucra la participación de un polisacárido extracelular. Este proceso empieza después de 8 horas de incubación y alcanza un nivel máximo después de 16 horas (Michiels *et al.*, 1991).

El movimiento de *Azospirillum* a lo largo de la superficie radicular es mínimo, debido a la formación de estas fibrillas producidas por la misma bacteria. Estas fibras de soporte aseguran el transporte vertical bacteriano debido al crecimiento de la punta radicular (caliptra) hacia capas de suelo más profundas. La adhesión fibrilar de la bacteria es dependiente de un metabolismo bacteriano activo, bacterias muertas no se adhieren a raíces, pero bacterias vivas sí se adhieren a materia vegetal muerta (Bashan y Holguin, 1993).

Se desconoce el mecanismo específico por medio del cual *Azospirillum* se adhiere a las raíces. Diversos factores químicos, fisiológicos, ambientales y nutricionales regulan la adhesión de *A. brasilense* a las raíces. A través de la utilización de un mutante de *A. brasilense* sin flagelos, se demostró que el flagelo polar está involucrado en la adhesión de las bacterias a las raíces, encontrándose que flagelos polares purificados se adhieren a raíces bajo condiciones *in vitro* (Croes *et al.*, 1993).

Parece ser que el mecanismo de adhesión a raíces y la agregación de células bacterianas se encuentran relacionados con el contenido de polisacáridos en la superficie bacteriana (Del-Gallo y Haegi, 1990).

Es posible que las microfibrillas de celulosa detectadas en los agregados celulares así como los polisacáridos extracelulares, estén participando en el proceso de infección en la rizósfera, provocando la agregación de las células bacterianas colonizadoras. Se propone que la formación de agregados es una ventaja ecológica para *Azospirillum* ya que permite a la bacteria establecerse en mayor concentración en la superficie radicular. Además bajo condiciones desfavorables, los agregados incrementarían la posibilidad de sobrevivencia de *Azospirillum* en la rizósfera. Esto es importante por varias razones: a) si las bacterias no se adhieren a la células radiculares, las sustancias excretadas por las bacterias se difunden hacia la rizósfera donde son consumidas por otros microorganismos. Sin embargo, si las bacterias se adhieren a la superficie radicular parte de estas sustancias penetran a los espacios intercelulares de la corteza radicular. b) Si no se encuentran firmemente adheridas, las bacterias pueden ser fácilmente desprendidas de la raíz por el agua, provocando

que mueran en el suelo ya que se ha demostrado que *Azospirillum* no sobrevive bien en suelos sin plantas (Bashan *et al.*, 1995). c) Los sitios disponibles de adhesión en raíces sin la presencia de *Azospirillum* son susceptibles de ser colonizados por otras bacterias no-benéficas. Concluyendo, el mecanismo de colonización radicular de *Azospirillum* varía dependiendo de la cepa bacteriana, especie vegetal, condiciones ambientales tales como humedad del suelo, temperatura y pH, factores químicos, fisiológicos y nutricionales y otros todavía no identificados. La interacción entre todas estas variables crea diferencias en grados y patrones de colonización radicular, tamaños poblacionales y sitios de colonización (Bashan *et al.*, 1996).

La ruta de infección y localización de *Azospirillum* depende del pasto o cereal. En el maíz, la infección del interior de la corteza parece ocurrir inicialmente en las ramas o ramificaciones laterales y de ahí se extiende longitudinalmente dentro: a) de las raíces principales, observándose a la bacteria entre y dentro de las raíces de la corteza, b) de los espacios intercelulares, entre la corteza y endodermis, c) de las células de la parte leñosa de la planta (xilema) y d) entre las células de la médula.

#### Mecanismos de acción de *Azospirillum* sobre el crecimiento vegetal

No se ha definido el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal. Sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos de acción.

##### *a) Fijación de nitrógeno por *Azospirillum**

El nitrógeno no puede entrar por sí solo a los sistemas biológicos, a menos que sea fijado o combinado con otros elementos (oxígeno o hidrógeno).

En la naturaleza, la fijación biológica de nitrógeno sólo es una facultad reservada a unos cuantos géneros de bacterias (incluidas entre estas bacterias, a las denominadas cianobacterias). Ningún organismo superior ha desarrollado esta capacidad, aún cuando varios participan indirectamente formando asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno.

Estudios sobre la inoculación de trigo y maíz han indicado que de un 5-10% y hasta 18% del N total de la planta se deriva de la fijación del mismo; además, las plantas inoculadas crecieron normalmente con solo una cantidad parcial del fertilizante requerido para tal crecimiento, aún en zonas templadas (en las cuales *Azospirillum* es menos efectivo) y bajo cultivo intensivo. Esta cantidad de nitrógeno fijado es insuficiente como para explicar incrementos totales en la acumulación del mismo en las plantas inoculadas. Niveles altos de fertilización nitrogenada (lo que inhibe la fijación de nitrógeno) no suprimieron la respuesta positiva de la planta a la inoculación (Bashan y Levanony, 1989).

Algunos resultados indicaron que las gramíneas son potencialmente capaces de establecer una simbiosis con bacterias diazotróficas y en la cual el simbiote excretor de amonio provee a las plantas huésped de una fuente de nitrógeno (Christiansen-Weniger y Van Veen, 1991).

Existe la posibilidad de que la fijación de nitrógeno aporte a la planta pequeñas cantidades del mismo, que puede ser de importancia significativa en etapas críticas del desarrollo vegetal, tales como reproducción y épocas de generación de retoños (Bashan *et al.*, 1996).

*b) Efectos hormonales de Azospirillum sobre la planta*

En 1979 Tien *et al.* encontraron que las auxinas (en particular el ácido indol-3-acético, IAA), las giberelinas y citocinas, producidas por las plantas y esenciales para su crecimiento y desarrollo, son producidas por varias bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno y que en algún momento pueden incrementar la velocidad de desarrollo y rendimiento de las plantas hospederas (Weier, 1980).

Cepas de *Azospirillum* producen diversas hormonas vegetales cuando son cultivadas en medios líquidos. Una de las principales es el IAA, la liberación de éste se incrementa con la presencia de amonio en el medio de cultivo, así como en el inicio de la fase estacionaria de las células por lo que se le considera un metabolito secundario (Omay *et al.*, 1993). Otras hormonas detectadas a niveles más bajos pero biológicamente significativos, son el ácido indoláctico, ácido indol-3-butinico (IBA), indol-3-etanol, indol-3-metanol, y compuestos de indol no identificados, también varias giberelinas, ácido abscísico (ABA) y citoquininas (Bashan *et al.*, 1996). Las hormonas vegetales pueden promover la capacidad de *Azospirillum* para fijar nitrógeno (Srisikandarajah *et al.*, 1993) así como su crecimiento (Strzelczyk *et al.*, 1994).

Estas sustancias producidas por la bacteria, son liberadas continuamente mejorando el desarrollo de la planta por efectos directos en procesos metabólicos, ya que al inducir la proliferación de pelos radiculares y raíces laterales incrementan la superficie activa de la raíz y la velocidad de absorción de nutrientes y agua, lo que se traduce en el aumento del peso seco de la planta (Tien *et al.*, 1979).

La inoculación con *Azospirillum* mejoró el equilibrio hormonal de una mutante de trigo defectuosa en la producción de hormonas. Se encontraron concentraciones más altas de IAA y IBA en raíces de maíz inoculadas que en plantas no inoculadas. La inoculación de plántulas de maíz con *A. lipoferum* alteró el equilibrio de giberelinas de las mismas (Fulchieri *et al.*, 1993).

La inoculación de *Azospirillum* a maíz cv. Hazera 851 (para harina de maíz), incrementa la producción de mazorcas (10.5%), el peso seco de la mazorca (10.4%), la altura de la planta (8.4%), la punta fresca (10.5%), el peso seco (23.2%), el número de semillas/mazorca de maíz (18.6%), el peso seco de las semillas (25.2%),

el peso de la mazorca de maíz (34.4%), el promedio del peso de una semilla (8.6%), el peso seco de raíces y retoños, tallo y acumulación de N total. La inoculación a semillas incrementa la producción de la materia seca (29.8%). La inoculación de *Azospirillum* a maíz desarrollada bajo condiciones templadas, incrementa la producción y N total (Ortega, 1989).

*c) Otras funciones de Azospirillum*

En la mayor parte de los efectos de la inoculación con *Azospirillum* en la planta están los cambios morfológicos en el sistema de la raíz.

Efectos positivos de la inoculación han sido demostrados en varios parámetros radiculares, incluyendo incremento en el largo de la raíz particularmente en la zona de elongación, incremento en el número y longitud de raíces laterales, volumen radical, número, densidad y apariencia superior de pelos radicales, aumento en el área de superficie radical, división celular en el menestemo radical, cambios del arreglo celular en el cortex y estimulación del exudado radical. Sin embargo, otros estudios indican claramente un decremento en longitud, masa y volumen radical, después un incremento en el crecimiento de vástagos y un cambio no aparente en el arreglo celular del cortex.

Se ha propuesto que el incremento en la absorción de minerales se debe a un incremento general en el sistema de raíces y no a un mecanismo de absorción de iones más eficaz. Por otro lado se cree que la inoculación con *Azospirillum* puede provocar que la absorción de iones en el suelo sea más eficiente (se desconoce el mecanismo de este proceso), lo que explica la acumulación de compuestos de nitrógeno en la planta sin existir una aparente fijación de nitrógeno. La planta puede asimilar el nitrógeno del suelo de manera más eficiente requiriendo menos fertilización nitrogenada (Bashan *et al.*, 1996).

Además de promover la absorción de minerales, la inoculación con *Azospirillum* mejora factores relacionados con el agua y la conductividad hídrica, se ha observado que la extracción total de humedad del suelo por parte de plantas inoculadas es mayor que en plantas no inoculadas y el agua puede ser extraída de capas más profundas del suelo (Sang *et al.*, 1992).

Mutantes de *Azospirillum* que producen IAA en cultivos afecta fuertemente la morfología radical, mientras que mutantes que no producen IAA no producen cambios en esta. La inoculación con *Azospirillum* mejora el balance hormonal de la defensa de la raíz (Barbieri *et al.*, 1995).

Factores que afectan la actividad de *Azospirillum*

La actividad nitrogenásica en las raíces resulta de una interacción complementaria entre la planta y la bacteria, y es afectada por varios factores dentro

de los que se encuentran la eficiencia fotosintética, translocación de productos fotosintéticos, fisiología de la planta, características del suelo y fisiología bacteriana.

*a) Energía y sustratos de carbono*

Dobereiner y Campelo, concluyeron que la disponibilidad de la energía y productos fotosintéticos representan los principales factores limitantes para la fijación biológica del nitrógeno, aunado a los exudados radicales que juegan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la población bacteriana en la rizósfera. La ruta fotosintética  $C_4$  capacita a la planta para hacer más eficiente el uso de algunas intensidades luminosas, las cuales incluyen en la naturaleza cualitativa y cuantitativa de los exudados radicales y por tanto en el carbono fijado y población en la rizósfera. El ciclo día-noche proporciona suficientes exudados radicales para mantener la fijación del nitrógeno durante la noche. El metabolismo del malato juega un importante papel en el suplemento de energía para la fijación de nitrógeno, pues el producto principal de la ruta fotosintética  $C_4$  en algunas especies como maíz y sorgo; y es el mejor sustrato para el desarrollo de *Azospirillum lipoferum* (Weier, 1980)

*b) Fluctuaciones estacionales o temporales*

La actividad nitrogenásica en los cereales fluctúa en todo el ciclo de crecimiento, observándose actividad máxima durante el desarrollo reproductivo de la planta en meses de otoño

En el maíz, existen dos puntos máximos de la actividad nitrogenásica asociados con el estado de crecimiento de la planta uno asociado con la emergencia de la seda o estado sedoso, es decir, cuando los óvulos son fertilizados y seguidos por la rápida división celular (estado de florecimiento), y el otro cuando las células están en multiplicación rápida en el endospermo y ha comenzado el hinchamiento del cereal (período de crecimiento activo e hinchamiento del grano).

*c) Nitrógeno combinado*

La actividad nitrogenásica en sistemas intactos suelo-planta de raíces de maíz, sorgo y pastos, puede ser reprimida por la adición de niveles altos de nitrógeno combinado o la excesiva aplicación de fertilizantes nitrogenados.

La actividad de la nitrogenasa en las raíces de maíz y sorgo, es inhibida variadamente cuando son expuestas a  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $NH_4^+$  durante el período de preincubación y es severamente inhibida después de la aplicación de grandes dosis de fertilizantes (200 Kg de N/Ha).

*d) Fluctuaciones diurnas*

Se ha observado en varios pastos que la actividad nitrogenásica sólo aumenta alrededor del medio día, mientras que en otras especies se observa un segundo

aumento durante la noche; como el caso del sorgo y maíz reportados por Balandreau (1986). Este aumento nocturno se atribuye a la hidrólisis de los fotosintatos almacenados, que fueron acumulados durante el día y su subsecuente translocación y exudación en la rizósfera.

#### e) pH del suelo

La máxima actividad se observa en suelos con pH de 7.3-7.6. Sin embargo, también es posible encontrarlo a un pH tan bajo como 4.8, siempre y cuando la concentración de aluminio sea baja.

Se ha observado que cuando ningún factor en el suelo (energía, sustratos de carbono, nitrógeno, oxígeno, humedad y temperatura) está limitado, la ocurrencia y capacidad de *Azospirillum* para fijar nitrógeno, es altamente dependiente del pH del suelo (4-8). También la fijación de nitrógeno en cultivos de *Azospirillum* varía ampliamente con el tipo de suelo, como a continuación se observa.

- Suelos salinos muestran las más altas reducciones de  $C_2H_2$ .
- Suelos ácidos, también presentaron apreciables reducciones de  $C_2H_2$  a pesar del bajo pH y alta conductividad eléctrica.
- Suelos con alto contenido de materia orgánica, muestran que *Azospirillum* tuvo baja actividad fijadora de nitrógeno.
- Suelos alcalinos muestran apreciable reducción de  $C_2H_2$  a pesar del pH alcalino desfavorable y alta conductividad eléctrica.

#### f) Temperatura

Day y Dobereiner (1976), encontraron que la temperatura óptima para el desarrollo y fijación del N de cultivos puros de *A. brasilense* y *Digitaria* está entre 31-40 °C; y la temperatura óptima para la actividad nitrogenásica de cultivos puros de *A. lipoferum* y raíces de maíz aisladas coinciden a 31 °C.

En cuanto a las variaciones de temperatura, se ha observado que tienen poca influencia en la fijación de nitrógeno en la asociación *Azospirillum-Zea mays*, por otra parte las cepas de *Azospirillum* aisladas de maíz y *Digitaria* no muestran diferencias en su actividad nitrogenásica a temperaturas óptimas (31-40 °C), pero a temperaturas inferiores (22°C), las cepas de *Azospirillum* aisladas de maíz son cinco veces más activas que las de *Digitaria*.

#### g) Fertilización del suelo.

En regiones o suelos cultivados, la presencia de *A. lipoferum* aumenta considerablemente, debido a que la cosecha y lixiviación eliminan gran parte del nitrógeno, haciendo más favorables las condiciones para que se lleve a cabo la fijación biológica, además de que rara vez es limitado este elemento en los sistemas en equilibrio.

### Distribución ecológica

Las bacterias de vida libre, fijadoras de nitrógeno, *Azospirillum*, se encuentran ampliamente distribuidas en suelos y asociadas a raíces de una amplia variedad de plantas, pastos y cereales (simbiosis asociativa) en las regiones tropicales y templadas. Döbereiner *et al.* (1976) reportó que el 60% se encuentra en suelos de la zona tropical y solo el 10% en las regiones templadas.

### Interacción de *Azospirillum* con microorganismos de la rizósfera

Después de su incorporación al suelo, las células de *Azospirillum* se deben adaptar rápidamente a las condiciones siempre cambiantes de la rizósfera, mismas que incluyen modificaciones frecuentes en la disponibilidad de nutrimentos, así como la interacción con bacterias nativas las cuales compiten también por los nutrimentos disponibles. Las interacciones pueden ser antagonistas, sinérgicas o del tipo predador-presa, en las cuales *Azospirillum* puede ser presa disponible para la micro-fauna necesitada de nutrimentos (Fabri y Del Gallo, 1995).

En contraste, la inoculación mixta con *Azospirillum* y hongos micorrizicos vesículo-arbusculares (V-A) origina una interacción sinérgica, obteniéndose un incremento significativo en crecimiento y en el contenido de fósforo de las plantas. Esta inoculación doble podría reemplazar la aplicación de fertilizantes de nitrógeno y fósforo (Al-Nahidh y Gomah, 1991) y promover la interacción de hongos V-A en plantas.

La inoculación mixta de *A. lipoferum* y el hongo V-A *Glomus intraradices* en plantas de sorgo, incremento todos los parámetros de crecimiento de las plantas, los niveles de fosfatasas en raíces así como la absorción de minerales, al compararse con inoculaciones únicas (Veeraswamy *et al.*, 1992). Al inocular trigo con *A. brasilense* y *Glomus* sp. se incrementó el peso fresco y seco de brotes y raíces (Gori y Favilli, 1995). La inoculación doble de *Glomus macrocarpum* y *A. brasilense* en las plantas por *Corchorus allitorus* promovió su crecimiento (Bali y Mukerji, 1991).

Se ha demostrado que algunos microorganismos del suelo, tales como Streptomicetos y hongos, ejercen efectos antagonísticos sobre *Azospirillum*, sin embargo, no se logró establecer si esto se debe a la producción de antibióticos. Muchas cepas de *Azospirillum* son altamente resistentes a una amplia gama de antibióticos, tales como streptomicina, rifamicina y penicilina. Aprovechando la resistencia natural de *Azospirillum* hacia los antibióticos, se ha mejorado la colonización radicular del mismo con un subsecuente incremento en el rendimiento de plantas de trigo cultivadas en maceta (Bashan *et al.*, 1996).

Se ha estimado que el tamaño poblacional de *Azospirillum* estaría dentro de los valores 0.001-1% de la población total de la rizósfera. Considerando que *Azospirillum* comprende solo una pequeña fracción de la población de la rizósfera, es de suponer

que muchas otras especies bacterianas afectaran positiva o negativamente a *Azospirillum* en la rizósfera y su participación deberá de tomarse en cuenta al incorporar *Azospirillum* al suelo (Bashan *et al.*, 1996).

#### Azospirillum como competidor en la rizósfera

Por definición, todo *Azospirillum* nativo es fijador de nitrógeno y capaz de satisfacer sus necesidades de nitrógeno. Dado que la actividad de la nitrogenasa es sensible a la presencia de oxígeno, éste debe fijar nitrógeno bajo condiciones microaerofílicas y más aún, algunas cepas presentan una marcada respuesta aerotáctica, que puede llegar a enmascarar otras propiedades relacionadas con sustratos químicos. *Azospirillum* produce vitaminas del grupo B (tiamina, biotina, riboflavina, ácido nicotínico y pantoténico) al cultivarse en medios líquidos y su crecimiento se ve afectado por la presencia de éstas (Dahm *et al.*, 1993; Rodelas *et al.*, 1993). La aplicación artificial de vitaminas al medio también afecta el crecimiento de *Azospirillum*. Casi todas las cepas son altamente móviles tanto *in vitro* como en el suelo, y poseen una significativa movilidad quimiotáctica hacia una gran variedad de compuestos. La respuesta quimiotáctica de *Azospirillum* no ha demostrado especificidad en cuanto al tipo de planta (Fedi *et al.*, 1992).

La presencia de sustancias atrayentes tanto como de repelentes determinaron la movilidad. Se propone que el traslado de *A. brasilense* de la raíz de una planta hacia otra es un paso preliminar al proceso de reconocimiento de la bacteria hacia la planta. El traslado de *Azospirillum* hacia las raíces de otras plantas es un proceso activo que no depende de la influencia de algún atrayente o repelente en particular y es influenciado posiblemente por el efecto global de los atrayentes y repelentes exudados por las raíces (Bashan y Holguin, 1994).

*Azospirillum* presentó quimiotaxis a concentraciones pico y nanomolares de ácidos aromáticos, por lo que se le considera con mecanismos sensoriales más sensibles para la detección de sustancias que otras bacterias del suelo pudiéndolas utilizar como fuentes de energía y carbono (López *et al.*, 1994).

*A. brasilense* migra hacia las raíces a través de secciones de suelo carentes de plantas y tienen capacidad de movilidad inter-radical. Mutantes no móviles presentan menos habilidad de colonizar que las cepas nativas. Las bacterias pueden ser transferidas pasivamente a grandes profundidades a través de las puntas de las raíces que se encuentren en proceso de crecimiento o por medio de su propia movilidad. Sus flagelos polares rotan en sentido de las manecillas del reloj así como en dirección contraria (Zhulin y Armitage, 1993).

Bajo condiciones de estrés tales como radiación ultravioleta, desecación o tensión osmótica y escasez de nutrimentos, *Azospirillum* es capaz de formar quistes, los cuales incrementan significativamente el índice de sobrevivencia de las células. También acumula grandes cantidades de PBH (hasta un 70% de su peso seco) el

cual puede ser almacenado para una bioconversión posterior o utilizado como fuente de energía cuando el organismo se enfrenta a escasez de nutrimentos (Bashan *et al.*, 1996).

Los estudios de sobrevivencia de *Azospirillum* en su nicho microecológico natural demuestran que este microorganismo sobrevive por periodos prolongados de tiempo y solo el tamaño de la población llega a variar. Las cepas de *Azospirillum* pueden sobrevivir en raíces durante la temporada de invierno bajo condiciones templadas pero el nivel de población se mantiene relativamente bajo. Germida (1986) observó un buen nivel de sobrevivencia en suelos de climas templados. Asimismo, se ha demostrado que *Azospirillum* sobrevive en raíces durante toda la temporada de crecimiento de cereales. En tanto que en zonas templadas se encontró que ocurre una transferencia de bacterias de la rizósfera a plantas ubicadas lejos del área marginal de inoculación, por medio de corrientes de aire (Bashan, 1991).

En contraste con sus características superiores ya mencionadas, *Azospirillum* puede ser parasitado por *Bdellovibrio sp.* en suelo y puede servir de presa a protozoarios nativos del suelo. Pero *Azospirillum* tiene potencia para mantener un buen nivel de sobrevivencia en la rizósfera (Bashan *et al.*, 1996)

#### Interacción de *Azospirillum* con partículas del suelo

La inoculación de plantas con *Azospirillum* en algunas ocasiones se ha realizado aplicando las bacterias directamente al suelo, junto a las plántulas germinadas. Durante este proceso, la bacteria es expuesta a fuerzas físicas y químicas naturales e interacciones que ocurren entre las bacterias y partículas del suelo. Para superar estas barreras y colonizar las raíces, *Azospirillum* tiene que generar la fuerza física suficiente como para poder desplazarse en el subsuelo. Las células de *Azospirillum* usualmente se encuentran adheridas de manera irreversible a la fracción superior del perfil del suelo, principalmente mediante interacciones electrostáticas con arcillas y materia orgánica (Levanony y Bashan, 1991).

Las condiciones físicas y químicas del suelo, tales como pH, grado de humedad y disponibilidad de sustancias químicas que atraen a las bacterias, afectan en diferentes grados de magnitud la adhesión de *Azospirillum* al suelo. La adhesión a arena pura, carente de arcillas y materia orgánica, es débil y es llevada a cabo por una red de puentes proteicos que entrelazan la célula bacteriana y las partículas de cuarzo. Las fibrillas bacterianas son esenciales para el anclaje de *Azospirillum*. La formación de puentes proteicos es controlada principalmente por la disponibilidad de nutrimentos los cuales serán utilizados para su síntesis (Bashan *et al.*, 1996).

### Aspectos agrotécnicos

Un objetivo importante es la aplicación comercial de *Azospirillum* en la agricultura moderna para el desarrollo de la comunidad. Sin embargo muy pocos estudios se han hecho al respecto. Efectos potenciales de la inoculación con *Azospirillum* en conjunto con compuestos químicos, aplicados en campos comerciales son muy notorios.

No se ha establecido la combinación óptima de *Azospirillum* y compuestos químicos. El problema es que no es sucesiva la aplicación de este inóculo en las cosechas. No se ha podido establecer el tiempo requerido por las plantas para interactuar con las bacterias. Técnicas de inoculación que sean prácticas, económicas y cómodas para el agricultor. El producto empleado debe ser suficiente para la planta y con alta competitividad con estándares comerciales. La concentración del inóculo que tiene efectos inhibitorios sobre el desarrollo de la planta, al igual que una baja concentración. El nivel óptimo del inóculo para semillas de cereales, vegetales y cosechas industriales puede ser de  $10^5$ - $10^6$  cfu/ml, para maíz  $10^7$  cfu/ml y para tomate *in vitro*  $>10^8$  cfu/ml. Sin embargo la concentración de  $10^8$  -  $10^{10}$  cfu/ml usualmente inhibe el desarrollo de la raíz. Sin embargo, estas concentraciones no tienen revelado, como muchas células bacterianas por semilla o planta están requeridas para obtener respuesta de la planta.

Existen pocos métodos de inoculación. El más simple es la inoculación aplicada directamente en forma líquida, ya sea en el suelo o directamente a la semilla. Esta técnica fue usada en numerosos experimentos de invernadero sobre producción, y solamente es inadecuado por causa de la mala sobrevivencia de *Azospirillum* en el suelo o en ausencia de un hospedero durante un período largo. Los resultados de una alta producción han sido obtenidos por la suspensión en turba, suficiente agua por surco o por aplicación granular del inóculo al tiempo de sembrar. Esta práctica de inoculación provee alguno de los requerimientos de un muy buen o adecuado inoculante bacterial, que otras técnicas más difíciles podrían dar y esto es probado por la inconsistencia de resultados. Una práctica usada es el encapsulado frío-seco de la bacteria, de forma sintética con un uso simple uniforme y biodegradable por los microorganismos del suelo y no tóxico en la naturaleza. Una vez que la bacteria está en el suelo y junto a un hospedero por largo tiempo se reproduce a gran escala.

## MAÍZ

El cultivo del maíz tiene una capital importancia en todos los órdenes de la vida humana, científica, tecnológica, social, económica y política. Su domesticación influyó de manera determinante en el desarrollo de las culturas, las conquistas y colonizaciones americanas. Por su gran diversidad de variedades y usos, la planta, grano o cultivo, ha sido ampliamente estudiados

### Descripción botánica

El maíz es un cereal cuya planta es monóica, con flores unisexuales y alóigama, su taxonomía es la siguiente, (González, 1995):

Reino	Vegetal
División o pylum	Tracheophyta
Sub-división	Pterapsidae
Clase	Angiosperma
Sub-clase	Monocotyledoneae
Orden	Graminales
Familia	Graminae
Tribu	Maydeae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>mays</i>

#### a) Raíz

El maíz tiene un sistema radical bien definido en 3 estadios. Al germinar, emergen las raíces *temporales* o embrionales que nacen en el primer nudo; las raíces *permanentes* que nacen en el segundo nudo de plántula o nudo superior del mesocotilo y las raíces *adventicias* que emergen de los nudos basales de la planta en crecimiento activo. (fig. 5).

Las raíces temporales primarias o embrionales son funcionales durante la germinación, emergencia y desarrollo de la plántula; generalmente desaparecen al agotarse el endospermo e inician las funciones de las raíces permanentes.

Las raíces permanentes son profusamente ramificadas en forma horizontal cerca de la superficie, alcanzando un diámetro de 1.3 metros y en profundidad más de 2 metros, intervienen en el sostén y nutrición de la planta en crecimiento activo hasta la madurez fisiológica.

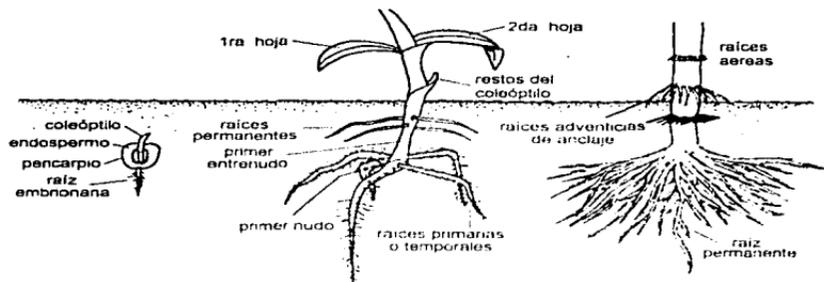


Figura 3. Germinación, plantula y planta adulta de maíz.

(Tomado de Reyes, 1990)

Las raíces adventicias, también llamadas permanentes, emergen en los nudos basales o inmediatamente cerca del suelo (fig. 6) al profundizar sirven de sostén o anclaje y como medio de absorción de nutrimentos (Reyes, 1990)

#### b) Tallo

El maíz es una planta anual, su tallo es una caña formada por nudos y entrenudos macizos, de longitud variable, gruesos en la base y de menor grosor en los entrenudos superiores (fig. 7). El número de nudos es variable en las diferentes razas y variedades con un rango de 8 a 26 (7 a 25 entrenudos). Potencialmente un tallo puede desarrollar 10 ó más yemas florales que pueden originar 10 ó más mazorcas; únicamente una, dos o tres yemas llegan a formar grano de maíz por el fenómeno conocido como "dominancia apical" que inhibe el desarrollo de las yemas inferiores.

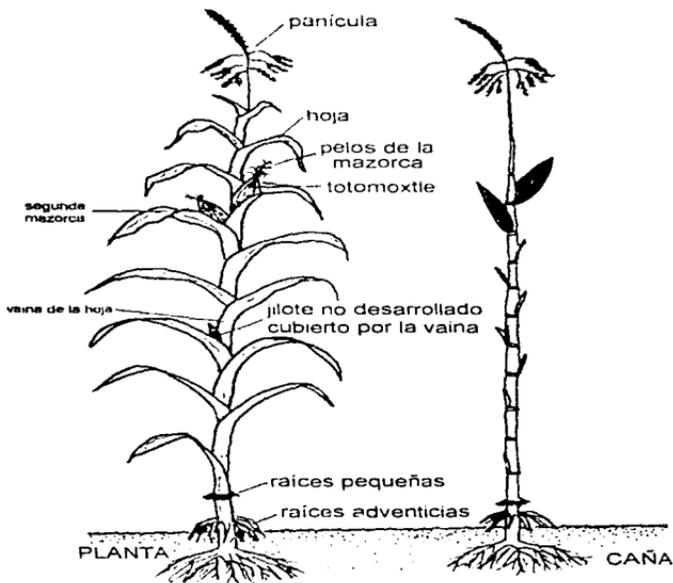
La altura del tallo es variable y es característica varietal, genética y ambiental, el rango varía de 0.30 m a 5.5 m y su altura es el resultado del número y longitud de los entrenudos (Reyes, 1990).

#### c) Hojas

Las partes de una hoja de maíz son: la vaina que envuelve al entrenudo y cubre la yema floral, lámina o limbo de tamaño variable en el largo y ancho, con una nervadura central bien definida, el haz o parte superior con pequeñas vellosidades, el envés o parte inferior lisa sin vellosidades; la lígula o lengüeta en la base de la hoja, parte pergaminosa; también en la base está la aurícula que envuelve al

entrenado. La aurícula y la ligula protegen al entrenudo y drenan el agua que al llover se desliza sobre el limbo y la nervadura central, (fig. 8).

Las hojas nacen en los nudos en la parte inferior inmediata a las yemas florales femeninas. Su distribución es alterna a lo largo del tallo. En los maíces de clima caliente las hojas son perpendiculares, anchas y largas; en las variedades de clima frío, las hojas son más angostas y cortas, más colgantes y muy flexibles, en ocasiones están ligeramente paralelas al tallo.



**Figura 4.** Estructura de una planta adulta de maíz.  
(Tomada de Reyes, 1990)

## d) Flores

El maíz es una planta monóica de flores unisexuales muy separadas y bien diferenciadas en una misma planta (fig. 9). Las flores masculinas se localizan en la inflorescencia terminal llamada "panícula", "panoja", "espiga" o "miahuatl".

La espiga está estructurada por un eje central, ramas laterales primarias, secundarias y terciarias; las panículas de las variedades de clima caliente son largas, muy ramificadas, y producen abundante polen, las de clima frío son más cortas, menos ramificadas, más laxas y producen menos polen. En el eje central o en las ramificaciones se distribuyen por pares alternamente a lo largo del eje o raquis, las espiguillas; cada espiguilla protegida por dos brácteas o glumas, y en su interior hay un eje o raquilla con dos flósculos, cada uno tiene la flor estaminada protegida por la lema y la palea. La flor está compuesta de 3 estambres, en la base de estos están 2 lodículos y un pistilo rudimentario (Reyes, 1990).

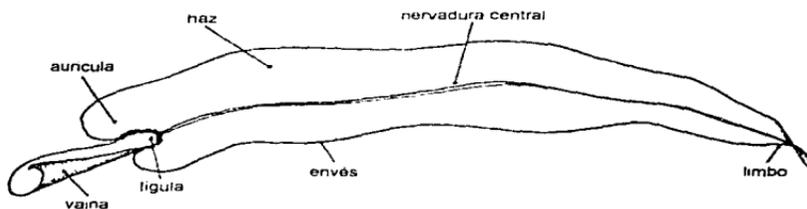


Figura 5. Estructura de una hoja de maíz.  
(Tomada de Reyes, 1990)

Las flores pistiladas se localizan en las yemas florales que emergen en las axilas de las hojas y que en el proceso de su desarrollo se denominan: yema floral pistilada, jilote, elote, elocinte (camahua o barroceo) y mazorca, (Reyes, 1990).

Las flores pistiladas se agrupan también por pares, distribuyéndose a lo largo de la inflorescencia femenina, que es una espiga cilíndrica: consiste de un raquis central u olote en donde se insertan a lo largo, las espiguillas por pares, con glumas, lema y palea rudimentarias.

Las flores pistiladas consisten en un ovario con pedicelo unido al raquis u olote; un óvulo único, un estilo muy largo con propiedades estigmáticas, es decir, en toda su longitud es receptivo y germina el grano de polen. La inflorescencia femenina está cubierta por brácteas cuyo conjunto forman el "Totomoxtle" (Reyes, 1990).

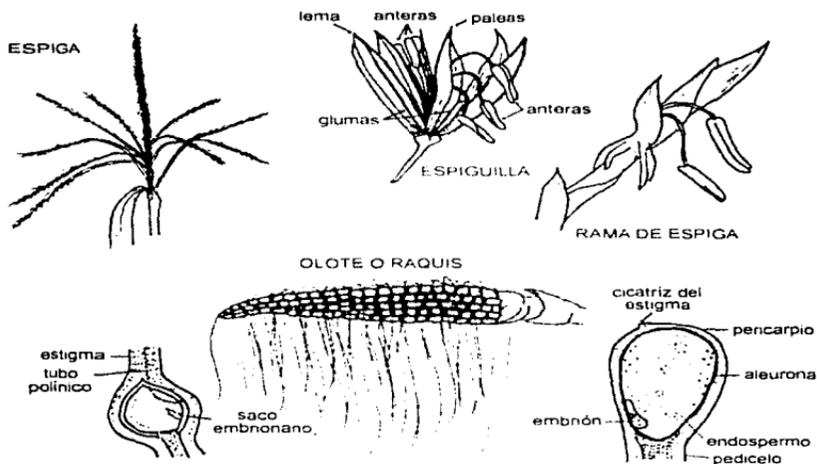


Figura 6. Estructuras florales en el maíz.  
(Tomada de Reyes, 1990)

#### e) Fruto

Los botánicos lo llaman cariósipide, los agricultores semilla y comúnmente se conoce como grano de maíz. El fruto se encuentra insertado en el raquis u olote constituyendo hileras de granos o carreras cuyo conjunto forman la mazorca, espiga cilíndrica o inflorescencia, producto del desarrollo de la yema floral axilar de la hoja que nace en el nudo (fig. 10). El número de carreras es par, y varía de 8 a 30. La figura 10 muestra que un grano de maíz está formado por las siguientes partes:

- **Pericarpio.** Cubierta del fruto y es la pared del ovario, es de origen materno. El color del pericarpio puede ser rojo o incoloro, el rojo es dominante.

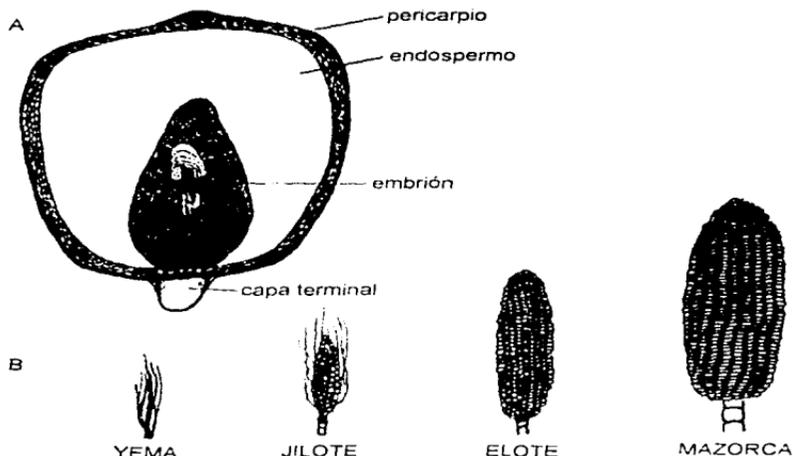


Figura 7. Estructura del grano de maíz maduro. A y B, infrutescencia.  
(Tomada de Reyes, 1990)

- **Endosperma.** Es el tejido de reserva de la semilla; el color del endospermo puede ser amarillo o blanco. La aleurona es una capa de células del endosperma, sustancia protéica en forma granular, se origina al madurar la semilla, al avanzar la deshidratación; la aleurona puede ser blanca o incolora, roja o bien, púrpura con intensidades variables.
- **Embrión.** El grano de maíz tiene en su embrión una planta en miniatura con su radícula, su plúmula con tres a cinco hojas, el escutelum o cotiledón y dos capas, el coleóptilo que cubre a la plúmula y la coleoriza que cubre a la radícula, (fig. 10). El grano es muy variable en su tamaño, composición, textura y forma. Lo más importante, es su valor como alimento por su alto contenido energético del endospermo, su embrión rico en aceite y biológicamente balanceado (Reyes, 1990).

f) *Mazorca*

Es la infrutescencia o espiga cilíndrica formada por el grano, el olote, el pedúnculo y la cubierta o totomoxtle, (fig. 11); el totomoxtle debe cubrir bien a la mazorca para protegerla de la humedad y del ataque de plagas y enfermedades; el pedúnculo debe ser largo y flexible, que permita que las mazorcas sea colgante para protegerla. El contenido del olote varía de 8 a 30%. Los agricultores prefieren las de olote delgado porque son más fáciles de cosechar, desgranar, secar el grano y en general, más precoces.

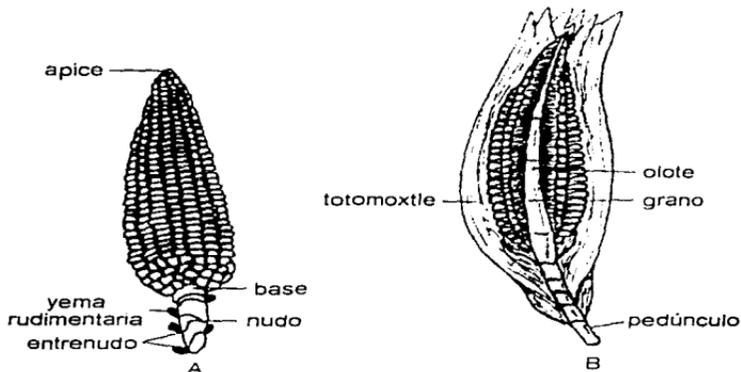


Figura 8. A. Mazorca completa de maíz y B, corte longitudinal.  
(Tomada de Reyes, 1990)

En la mazorca hay una amplia variación en forma tamaño y número de hileras. La magnitud de la mazorca y su número son de mayor importancia por ser elementos correlativos en el rendimiento del grano; tales componentes son: longitud, número de hileras, peso del grano y número de mazorcas por planta. Los atributos anteriores se ven sumamente afectados por el ambiente. (Reyes, 1990).

### Adaptación

En general se puede decir que el cultivo de maíz es susceptible de aprovecharse en regiones agrícolas bajo las siguientes condiciones:

- a) Temperatura. La temperatura media óptima para la producción de maíz debe oscilar entre 20 y 30 °C, pero puede ser mayor o menor según las distintas regiones agrícolas.
- b) Altitud. Se cultiva el maíz con buenos rendimientos desde el nivel del mar, hasta alrededor de 2 500 msnm, sin embargo se puede cultivar en altitudes mayores a los 3 000 msnm, pero los rendimientos disminuyen, sobre todo por bajas temperaturas.
- c) Latitud. En general, el maíz se adapta desde mas o menos 50º de latitud norte, hasta los 40º de latitud sur. Las regiones mas productoras de maíz se localizan entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio.
- d) Suelo. Prácticamente prospera en cualquier suelo, pero en forma general el maíz necesita suelos profundos y fértiles para dar buena cosecha. El suelo de textura franca es preferible para el maíz. Esto permite un buen desarrollo del sistema radicular, con una mayor eficiencia de absorción de la humedad y de los nutrimentos del suelo. Además, se evitan problemas de acamé o calda de las plantas. Los suelos con estructura granular proveen en buen drenaje y retienen el agua. Además, son preferibles los suelos con un alto contenido de materia orgánica. Se obtiene una mejor producción cuando la calidad y acidez del suelo están balanceadas, el pH óptimo se encuentra entre 6 y 7, (Robles, 1983).

#### Utilización e importancia del maíz

El maíz ha sido alimento, moneda y religión para el pueblo de México. Durante siglos, la historia nacional y las condiciones de vida de los mexicanos han estado asociadas estrechamente a su cultivo. El maíz era tan importante en las sociedades mesoamericanas que muchas ceremonias se dedicaban a *Centéotl*, dios azteca del maíz, o a *Yum Kaak*, dios del maíz y la vegetación en la cultura maya, (Figueroa *et al.*, 1994).

Así, sus múltiples usos se pueden agrupar en los siguientes rubros, (Reyes, 1990; González, 1995):

1. Grano:
  - Alimentación humana,
  - alimentación del ganado,
  - materia prima en la industria,
  - semilla.
2. Planta:
  - Forraje verde,
  - ensilado,
  - rastrojo, forraje tosco,
  - materia orgánica del suelo.

3. **Mazorca:**  
Elote alimento humano,  
forraje tosco,  
olote (combustible).

En varios países como México, tienen escaso uso ganadero. El maíz se aprovecha directamente como alimento humano (tortillas, bollos, arepa, elote, etc.), o como materia prima en la industria alimentaria (harina, maicena, aceite, mieles, etc.) e industria diversa.

Se estima que son más de 800 artículos, que utiliza la humanidad, en los que interviene el maíz. Esto es porque todas las partes, excepto las raíces, de la planta se utilizan, aun cuando las raíces son también fuente de materia orgánica del suelo.

En México, la mayor parte de la producción del maíz es para uso del grano como alimento humano en la fabricación de tortilla y/o la fabricación de harina de maíz nixtamalizado. En nuestro país más del 50% del volumen alimentario lo constituye el maíz; el complemento lo integran más de 30 especies de diversas plantas, que incluyen tubérculos, raíces, tallos, hojas, flores y frutas, en adición se consumen diversas frutas silvestres y cultivadas, así como carne de varias especies animales domésticos y silvestres, (González, 1995)

Por su variedad de usos al hombre, su importancia puede analizarse en diversos aspectos:

*a) Científico*

Como recurso biológico para explicar teorías, principios y leyes que han contribuido en los avances de las ciencias biológicas y sus aplicaciones en agronomía; en la creación de nuevas tecnologías que se aplican en fitotecnia y conocimiento de causas que explican los efectos en diversos caracteres de plantas y animales. Además es una planta de amplio espectro en su utilidad para múltiples ejemplos y medios de ayuda en cursos de biología, química y agronomía. Son escasas las especies de plantas que compiten con el maíz.

*b) Social*

Como ya se mencionó, el maíz significa trabajo, moneda, pan y religión para grandes conglomerados humanos. La agricultura es un oficio para el trabajador que emplea sus fuerzas musculares para realizar diversas actividades agrícolas como medio de obtener un ingreso; es un arte para el productor que emplea su inteligencia directriz, sus artificios, habilidades y conocimientos administrativos, económicos y de planeación para obtener mayor productividad de tierra y es una ciencia para el agrónomo o profesional relacionado que estudia las relaciones causa-efecto, las leyes y principios que rigen el proceso agrícola, plantea hipótesis y las prueba por medio de experimentos diseñados conforme al método científico, modifica, mejora, crea y desarrolla nuevas tecnologías o descubre hechos.

En grandes áreas de México y del mundo, el cultivo de maíz es actividad y alimento de los pueblos; por lo tanto, una escasez acarrea grandes problemas sociales. En la década de 1940, algunos economistas proponían al gobierno la política de importar todo el maíz, ya que en el mercado internacional el precio por tonelada era menor que el producido en el país, fenómeno que aún existe; estuvo a punto de realizarse tal error, si no hubieran intervenido varios agrónomos, quienes formaron la Comisión del Maíz, la cual evolucionó en Comisión Nacional del Maíz, hasta la actual Productora Nacional de Semillas (PRONASE).

La soberanía del país, la desocupación de grandes grupos humanos, el abandono y desperdicio de suelos y grandes convulsiones sociales hubieran sido las consecuencias si el gobierno hubiera seguido tales políticas. Los programas de fitogenotecnia del maíz diseñados en 1940 demostraron que ese grupo de agrónomos tenían la razón (Reyes, 1990).

*c) Económico*

La importancia del maíz en el mundo y en México, se manifiesta por los siguientes rubros: significa bienestar económico para los países autosuficientes y/o exportadores; los múltiples usos como alimento humano directo o transformado en carne, huevo, leche y derivados; como insumo en la industria; por su amplia área geográfica de cultivo, ya que se encuentra en 134 países dispersos en el mundo (82% de los países lo producen) y por su alto volumen de producción. (González, 1995).

---

## ANDISOLES

El suelo es la capa mineral superficial de la capa terrestre producto del material geológico, por acción de agentes físicos, químicos y biológicos, con material capaz de soportar crecimiento vegetal. Algunos suelos son productivos por naturaleza y mantienen cultivos abundantes de gran valor con poco esfuerzo humano, a diferencia de otros tan improductivos que casi no conservan por sí solos la vida de la planta útil. (Thamhane *et al.*, 1986).

En la zona de estudio predominan los suelos ando, y en el territorio nacional ocupan una superficie de 7.3 millones de ha., extendiéndose en una franja irregular desde el Pacífico hasta el Golfo de México y áreas aisladas de Yucatán, Oaxaca, Guerrero, Michoacán y Jalisco, (Ortiz, 1985). A continuación se dan algunas características de estos.

Los suelos de ando están constituidos mineralógicamente por vidrio volcánico 53.4%; plagioclasa 29.8%; piroxenos 13.3% y titanomagnetita 3.5%. Estas cenizas volcánicas en su primera fase de meteorización (lixiviación de bases y sílice) dan lugar a materiales amorfos, tales como alófanos, geles de alúmina y geles de hierro y sílice, (Kohashi, citado por García y Hernández, 1994).

Los andisoles contienen minerales en grandes cantidades de vidrio volcánico, sílice y labradotita en la riolita, augita, horblenda y olivino en basaltos y andesitas. Sus propiedades físicas, químicas y biológicas son resultado de la naturaleza y comportamiento de sus componentes.

La principal característica de los suelos ando, es su alto contenido de alófono en su fracción arcillosa, que influye directamente sobre sus propiedades.

### Propiedades

Son suelos minerales en que la fracción activa está dominada por el material amorfo (50% como mínimo) Presentan una gran capacidad de adsorción, un horizonte A relativamente grueso, oscuro, relativamente friable, rico en materia orgánica, con baja densidad aparente y poca plasticidad. Llegan a presentar horizonte B sin mostrar un movimiento significativo de arcilla. Estos suelos se encuentran bajo condiciones de climas húmedos y subhúmedos.

La mayor parte de estos suelos son de avenamiento libre, fáciles de labrar en todos los grados de humedad y poseen suficiente fertilidad natural para dar rendimientos moderados de maíz y otros cultivos tradicionales de subsistencia. Sus limitaciones principales son la posibilidad de erosión y la carencia de fosfatos en formas aprovechables por las plantas en desarrollo.

*Propiedades físicas*

De acuerdo con Wright, citado por Segura (1982), los suelos de ando presentan las siguientes características físicas:

- a) Perfil profundo frecuentemente con una estratificación clara debido a la deposición son friables en la parte superior.
- b) Las capas superiores del suelo presentan espesores hasta de un metro y su color varía de gris oscuro a negro.
- c) El subsuelo presenta colores que van de gris amarillento a rojizo y cuando el suelo está húmedo, es grasoso al tacto.
- d) Todo el perfil en general es muy liviano y poroso.
- e) Casi no hay adherencia ni plasticidad en húmedo, a excepción de las capas estratificadas más viejas y profundas, y
- f) Fácilmente erosionables.

La densidad aparente de estos suelos es baja y normalmente se encuentra entre 0.45 a 0.75 g/cc. Como consecuencia de esto, la cantidad de nutrientes por unidad de volumen de también baja. Por lo que en ocasiones se ha observado efectos favorables en el crecimiento de los cultivos al compactar el suelo. La textura varía de franco a migajón arcillo-arenoso. En estos suelos la fase sólida, líquida y gaseosa generalmente ocupan un 20%, 30% y 50% en base a volumen, respectivamente. Por otra parte, debido a la gran cantidad de poros pequeños (Egawa, 1980), por la gran superficie específica del alófono y amplios contenidos de materia orgánica, estos suelos tienen una alta capacidad de retención de humedad, lo cual es aprovechable por los agricultores en las siembras con humedad residual (Vergara, 1992)

*Propiedades químicas*

Estos suelos tienen un alto contenido de materia orgánica en su horizonte superficial que varía de 7.5% a 40.3% (Egawa, 1980). Sin embargo, la relación carbono/nitrógeno es generalmente más alta que en los suelos minerales comunes. Cuando los suelos se abren por primera vez al cultivo la materia orgánica comienza a mineralizarse y suministra nitrógeno para los cultivos. Sin embargo, después de varios años dependiendo de la intensidad de la explotación, se puede presentar una deficiencia de nitrógeno (Tanaka, 1980).

El pH de los suelos es ácido y presenta una gran cantidad de aluminio activo, lo cual determina en gran medida la poca disponibilidad del azufre, así como la baja eficiencia de los fertilizantes fosfóricos (Tanaka, 1980)

Comúnmente la capacidad de intercambio catiónico es de 30 a 60 meq. por 100 g de suelo. Sin embargo, en vista de que una gran parte de los sitios de intercambio están ubicados en sustancias orgánicas y en el alófono, y que estos sitios de intercambio se comportan como ácidos débiles, la capacidad para impedir la lixiviación de los cationes de estos suelos es baja, estos ocasiona que dichos suelo

sean generalmente de carácter ácido y que gran parte del potasio y el amonio se pierdan por lixiviación, de ahí que los cultivos pueden mostrar con el tiempo deficiencia en potasio y nitrógeno (Tanaka, 1980).

Relacionado con lo anterior se observa que muchos de estos suelos poseen una alta acidez intercambiable en su condición nativa, proveniente fundamentalmente de las sustancias orgánicas. Además estos suelos generalmente tienen bajos contenidos de calcio intercambiable y algunas veces también bajo contenido de magnesio (Vergara, 1992).

Por otra parte, los micronutrientes pueden presentarse como deficientes en este tipo de suelos, tanto como por los procesos de lixiviación como por la quelatación, originada por las grandes cantidades de materia orgánica. Esto es importante considerarlo, puesto que en ocasiones las aplicaciones de cal han dado lugar a que aparezcan o se acentúen deficiencias de magnesio y boro (Tanaka, 1980).

#### Adsorción de fosfatos

La retención de los fosfatos por las arcillas ha sido tema de estudio de numerosos investigadores, se considera a las arcillas del suelo y ciertos materiales artificiales como superficie de adsorción. En los andisoles son los alófanos los causantes principales de la fijación.

##### *Alófano*

Los suelos de ando se caracterizan, debido a su origen y proceso de formación por tener una gran cantidad de compuestos químicos no cristalizados y de alta reactividad, llamados alófanos.

Los alófanos incluyen materiales naturales de diverso origen que puede ser formado a partir de rocas ígneas básicas por intenso intemperismo o de rocas más ácidas por podzolización o en depósitos subterráneos de agua que contiene sílice y alumina disueltos (Vergara, 1992).

#### Mecanismos de adsorción de fosfatos

Existen dos mecanismos principales mediante los cuales se explica el proceso de retención de fosfatos en el suelo.

- a) Retención de fosfatos por adsorción: El fosfato es adsorbido sobre las superficies reactivas del suelo (óxidos de hierro y aluminio, alófano y arcillas), en donde ocurre un intercambio de adsorción entre el ion hidróxido y los iones fosfato. La especie iónica de fosfatos al ser retenida está determinada por el pH, siendo los

iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ , los que se encuentran en mayor proporción a los pH usuales en suelos de ando.

- b) Retención de fosfatos por precipitación: La caolinita puede disociarse en iones de aluminio y silicato si en el medio hay poca actividad de los mismos. Por medio de adiciones de fosfatos lograron un incremento en la concentración de silice en la solución. Jackson (citado por López, 1974) encontró que al agregar soluciones concentradas de fósforo al óxido de hierro e hidróxido de aluminio coloidal, aparecían precipitados con fosfatos, esto sólo ocurre a pH muy ácidos y de hecho en suelos ácidos templados como los de ando.

#### Efectos de la acidez del suelo sobre las plantas

Los diversos efectos que ejerce la acidez del suelo sobre las plantas pueden ser directos o indirectos. Las influencias directas son: a) efectos tóxicos de los iones de H sobre los tejidos de la raíz; b) influencia de la acidez del suelo sobre la permeabilidad de las membranas de la planta para los cationes, y c) perturbación en el equilibrio entre los constituyentes básicos y ácidos a través de las raíces.

La acidez del suelo ejerce efectos directos perjudiciales sobre las plantas, en especial porque influye sobre los cambios enzimáticos, ya que las enzimas son particularmente sensibles a los cambios de pH.

Las influencias indirectas son: a) disponibilidad de nutrimentos diversos, (por ejemplo cobre y zinc); b) solubilidad elevada y disponibilidad de elementos como aluminio, manganeso y hierro en cantidades tóxicas; c) afectadas desfavorablemente, las actividades benéficas de los microorganismos del suelo; d) prevalencia de enfermedades de la planta, y e) deficiencia de nutrimentos como calcio, potasio y fósforo. (Tamhane *et al.*, 1986).

#### Efectos de la cal sobre el suelo

Los suelos muy ácidos no son productivos. Para aumentar la productividad de los suelos ácidos, el encalado es el primer paso, por las siguientes razones (Tamhane *et al.*, 1986):

1. La cal hace más eficiente al fósforo. Esto sucede principalmente porque en los suelos ácidos el fósforo es fijado por el hierro y el aluminio solubles. El encalado reduce la solubilidad de ambos y por consiguiente se retiene menos cantidad de fósforo en estas formas insolubles e inobtenibles.
2. La cal hace más eficaz al potasio en la nutrición de la planta. Cuando es abundante, todas las plantas absorben más potasio del que necesitan. La cal reduce la aspiración excesiva de potasio. Desde los puntos de vista nutritivo y económico ésta es una buena práctica. Cuando abunda la cal, las plantas consumen más calcio y menos potasio. Desde el punto de vista económico, la

práctica del encalado es aconsejable, porque la planta absorbe más calcio barato y menos potasio caro.

3. La cal aumenta la obtenibilidad de nitrógeno al apresurar la descomposición de la materia orgánica.
4. La cal proporciona calcio y magnesio (si la cal es dolomítica) para la nutrición de la planta.
5. Las bacterias benéficas del suelo son estimuladas por suministros adecuados de cal en el suelo.
6. El aluminio, el manganeso y el hierro perjudiciales se tornan insolubles e inofensivos cuando un suelo está bien abastecido de cal.
7. Un buen programa de encalado durante un periodo de años mejora la condición física del suelo, ya que reduce su densidad de masa, aumenta su capacidad de infiltración e incrementa su velocidad de filtración de agua.
8. Siguiendo un programa adecuado de encalado hay menos erosión del suelo. Esto se debe, fundamentalmente, al vigor y densidad mayor de las plantas, después de la aplicación de cal y a la mayor capacidad de infiltración de agua que reduce el escurrimiento e incrementa la cantidad de agua disponible para los cultivos.

#### Funciones de la composta en el suelo

Por su composición, textura y origen, la composta tiene varias funciones en el suelo (Jeavons, 1991).

- **Mejora la estructura.** El humus disgrega la arcilla y los terrones, y aglutina a los suelos arenosos. Ayuda a una mejor aireación en los suelos arcillosos y arenosos.
- **Retiene humedad.** El humus retiene 6 veces su peso de agua. Un suelo con buen contenido de materia orgánica absorbe el agua de lluvia como una esponja y la pone a disposición de las plantas a medida que van necesitándola. Un suelo desprovisto de materia orgánica no permite la penetración del agua lo que propicia la formación de costras, la erosión y la inundación.
- **Promueve la aireación.** Las plantas pueden obtener del aire, el sol y el agua el 96% de los nutrimentos que necesitan. Una tierra sana y suelta ayuda a que el aire se difunda en el suelo, además de contribuir al intercambio de nutrimentos y de humedad. El bióxido de carbono que se desprende durante el proceso de descomposición de la materia orgánica se difunde hacia el exterior y es absorbido por la "bóveda" que forman las hojas de las plantas cuando éstas se siembran cerca unas de otras y crean un microclima.
- **Sirve de abono.** La composta contiene algo de nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y azufre, pero su importancia radica en el contenido de nutrimentos. El principio básico es regresar a la tierra todo lo que se le ha extralado, mediante el aprovechamiento de los residuos vegetales y los estiércoles.

- **Almacena nitrógeno.** El montón de composta es un almacén de nitrógeno. Durante el período que dura el proceso de descomposición de la composta ese nutrimento soluble en agua permanece retenido, y así se evita la lixiviación o su oxidación en el aire.
- **Nivela el pH ("efecto buffer").** Un suelo con un contenido adecuado de composta ayuda a que las plantas resistan mejor los cambios de pH.
- **Neutraliza las toxinas del suelo.** Recientemente se han realizado estudios importantes que muestran que las plantas cultivadas en suelos con composta orgánica asimilan cantidades inferiores de plomo, metales pesados y otros contaminantes urbanos, en compactación con las plantas que se cultivan en otro tipo de suelo.
- **Libera nutrimentos.** Los ácidos orgánicos disuelven los minerales del suelo y los hacen accesibles para las plantas. Al descomponerse la materia orgánica libera nutrimentos para las plantas y para la población de microorganismos del suelo.
- **Es alimento para la vida microbiana.** Una buena composta crea condiciones saludables para los organismos que viven en el suelo. La composta es un cobijo para las lombrices de tierra y para los hongos benéficos que atacan a los nemátodos y otras plagas del suelo.

## ANTECEDENTES

Pacovsky (1989) trabajó con plantas de maíz (*Zea mays* L.) que inoculó con hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus etunicatum*), una cepa de *Azospirillum brasilense*, y con ambos endofitos juntos. Todas las plantas fueron cultivadas en relativa fertilidad. Adicionalmente, cultivó plantas no inoculadas pero fertilizadas con nitrógeno y fósforo para compensar el consumo de nutrientes. En general, encontró que las plantas de maíz colonizadas por *Glomus* contenían más zinc y cobre, pero menos fósforo, almidón, prolina, trionina y alanina que las plantas P-fertilizadas. Las plantas colonizadas por *Azospirillum* contenían menos nitrógeno, azúcares y proteínas solubles, leucina e isoleucina, pero fueron las de mayor área foliar y contenido de glutamato que las N-fertilizadas. La fisiología de las plantas doblemente inoculadas fue independiente del estado mineral del hospedero.

Por su parte Villarreal *et al.* (1990) establecieron un diseño experimental con 36 tratamientos, utilizando trigo Cu Comondu y suelo de Lomas de San Juan, Texcoco, México. Se inoculó con hongos micorrízicos *Glomus* y *Azospirillum*, o ambos microorganismos y el testigo sin ningún inoculante. Se fertilizó con tres dosis de nitrógeno (0, 40 y 80 Kg/ha) y tres de fósforo (0, 15 y 30 Kg/ha). Encontraron que la inoculación individual o en forma conjunta no incrementó la producción de biomasa de la parte aérea del trigo, siendo la doble inoculación la que presentó menor cantidad de materia seca, esta misma situación se presentó al determinar peso seco de raíz. Dado que el suelo donde crecieron las plantas estaba bien abastecido de fósforo asimilable no se estableció la micotrofia, por lo que se inhibió el crecimiento de las plantas micorrizadas. Además, como ambos endofitos (*Azospirillum* y hongo micorrízico *Glomus*) ocupan la misma área cortical en las raíces de las gramíneas colonizadas, se presentaron interacciones directas entre los tres simbiontes, lo que pudo resultar en un aumento en el crecimiento o en una competencia por los fotosintatos producidos por el hospedero.

Otro estudio, realizado por Al-Nahidh y Gomah (1991), también tuvo la finalidad de investigar el efecto de la doble inoculación, *Azospirillum* y micorriza V-A, sobre el crecimiento y nutrición del trigo. En este se determinaron los efectos de la irrigación con aguas residuales y la fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio (NPK). Sus resultados registraron altos incrementos de materia seca y acumulación de nitrógeno y fósforo en los tratamientos VAM+*Azospirillum* y NPK. La inoculación con VAM o *Azospirillum* tuvo efectos similares en el crecimiento del trigo, pero inoculando con ambos organismos el crecimiento fue mayor que cuando se usó uno sólo. Se presentaron incrementos de materia seca, raíces y espigas sobre los grupos control. La producción de materia seca y contenido de nitrógeno de las plantas tuvo relación con la actividad de la nitrogenasa tanto de la rizósfera como de la raíz libre de suelo. El contenido de N y P y la producción de materia seca tuvieron relación significativa con la infección VAM. Se encontró que *Azospirillum* es estimulada por VAM, indicando que ambas contribuyen en el crecimiento y nutrición del trigo.

Ortiz-Caton y Ferrera-Cerrato (1996), al conocer el efecto de la interacción micorriza-*Azospirillum* y la adición de azufre sobre el crecimiento de cebolla en campo, encontraron que la micorriza actuó en forma antagonista sobre la población de *Azospirillum* en el tratamiento con la doble inoculación y que la mayor colonización micorrizica se presentó en la interacción *Azospirillum*-Micorriza-Azufre, por lo que consideraron al azufre como un factor favorable, importante, para el sinergismo entre los dos microorganismos. La mayor acumulación de nitrógeno fue del tratamiento Micorriza-Azufre, y la de fósforo en Micorriza y *Azospirillum*-Micorriza-Azufre. A la cosecha, los tratamientos con mayor rendimiento fueron Micorriza, *Azospirillum*-Azufre y *Azospirillum*-Micorriza-Azufre, este último registró el mayor peso seco total, dado que tuvo el mayor número de bulbos pero de menor tamaño, dado que el efecto sinérgico entre la micorriza y *Azospirillum* está en relación a la producción de sustancias promotoras de crecimiento.

Gavito y Varela (1990) realizaron un estudio en cinco campos de maíz en el Estado de Morelos, México, para determinar la cantidad y la efectividad de las poblaciones nativas de hongos micorrizicos vesículo-arbusculares (MVA). Se contó el número de esporas y de propágulos viables (número más probable). Se evaluó la efectividad de estas poblaciones a través del crecimiento de dos plantas con diferente dependencia micorrizica, *Zea mays* y *Leucaena leucocephala*. Aún cuando el nivel de fósforo disponible fue alto en todos los suelos, el efecto de las poblaciones nativas de hongos MVA sobre el crecimiento de las plantas ensayadas fue ligeramente positivo en algunos casos. El factor más importante que influyó sobre la abundancia de estos hongos fue el manejo de los suelos, observándose una menor cantidad de propágulos de hongos en los terrenos con agricultura mecanizada y donde no hay rotación de cultivos o ésta se hace con plantas poco micótrofas.

Igualmente, Gavito y Varela (1993) trabajaron en cuatro cultivos de maíz, todos bajo las mismas prácticas de manejo. Ellos evaluaron el porcentaje de infección y el número de esporas siguiendo las dinámicas micorrizicas con relación a algunos parámetros agronómicos propiedades del suelo y el ciclo de la planta hospedera. Encontraron una gran infección micorrizica en plantas jóvenes, pero fue disminuyendo lentamente hasta la madurez de las mismas. La esporulación ocurre también en plantas maduras, sin embargo el número disminuyó drásticamente entre el invierno y la primavera. Concluyeron que las prácticas de agricultura tradicionales mantienen un gran número de esporas y de infecciones micorrizicas en campo.

En 1995 Asmah estudió el efecto de dos fuentes de fósforo (superfosfato triple y roca fosfórica) con dos dosis (22 y 44 Kg/ha) sobre la infección de hongos MVA a raices de maíz en un oxisol y un alfisol. Determinó producción de materia seca, contenido de nutrimentos y crecimiento del maíz. Respecto a la infección VAM sobre la raíz, no encontró diferencia significativa entre el tratamiento 44 Kg P/ha y el control sin P. Los porcentajes de colonización fueron significativamente mayores cuando se aplicó 22 Kg P/ha. El tratamiento con roca fosfórica, en ambas dosis, produjo una infección de raíz mayor a las obtenidas en el control o cuando se utilizó superfosfato triple en dosis de 44 Kg/ha. El fósforo asimilado por las plantas se incrementó en

ambos suelos en comparación con el testigo. La producción de materia seca fue significativamente mayor en el tratamiento de roca fosfórica a 22 Kg/ha.

Probando el efecto de dos inóculos de hongos VAM (2 especies probadas y mixto de poblaciones nativas) sobre el crecimiento del maíz criollo. Gavito y Varela (1995) aplicaron, a nivel de invernadero, tres dosis de fósforo (0, 40 y 80 kg/ha). *Glomus mosseae* (LMSS) produjo un rango bajo de crecimiento en los dos niveles bajos de fertilización. En el caso de *Acaulospora biradiculata* (ABRT) y las poblaciones nativas (NP), el crecimiento fue bajo en todos los niveles de fertilización. Los rangos de crecimiento fueron altos para los tratamientos no-micorrizados y controlados con niveles bajos de P, y bajos para el testigo con altas dosis de fertilizante. Los tratamientos ABRT y NP registraron bajos crecimientos con cualquier aplicación de P. El control no-micorrizado tuvo bajos rangos de crecimiento a bajas dosis de P, pero éste crecimiento aumentó linealmente al incrementarse la fertilización. Los porcentajes de colonización micorrizica fueron similares en los tratamientos inoculados con LMSS y ABRT, y bajos con la NP.

Con la finalidad de comparar el efecto del biofertilizante respecto a la aplicación de químicos y de seleccionar cepas que contribuyan al incremento del rendimiento y/o materia seca de maíz. Rangel y Vergara (1989) aplicaron 3 niveles de fertilización química (0, 40 y 80 kg/ha) e inocularon las semillas de maíz con las cepas Mt, Vs7, Sp7 y Cd de *Azospirillum*. Encontraron que el uso de químicos nitrogenados condujo a resultados comunes en área foliar, rendimiento de grano, materia seca y número de granos en 100 g, en comparación a las cepas probadas, debido a que la bacteria fue afectada por el pH (5.5), temperatura (21-23 °C) y por el fertilizante químico.

Al determinar el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico sobre algunas características agronómicas del maíz, Mendoza y Garza-Curcho (1990) encontraron que las poblaciones bacterianas incrementaron en los tratamientos inoculados con *Azospirillum* y disminuyeron en donde se aplicó fertilizante químico. Se encontró una mayor cantidad de N en el suelo de los tratamientos inoculados, pero la mayor cantidad de fósforo aprovechable se obtuvo en los fertilizados químicamente. La materia orgánica aumentó en todos los tratamientos, excepto en el que se usó fertilizante. También encontraron, en cuanto a fenología del maíz, que el tratamiento con *Azospirillum* reportó el menor número de días a la floración y con ello, la madurez fisiológica y el tiempo a la cosecha fueron más rápidos.

García *et al.* (1995) determinaron el efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense*) en forma individual y en mezcla sobre el crecimiento de maíz (*Zea mays* L.) en suelo no estéril, rico en materia orgánica. En general, sus resultados mostraron el mayor crecimiento del maíz en el tratamiento con inoculación que en el control sin nitrógeno. El alto contenido de materia orgánica del suelo tuvo influencia positiva en la respuesta del maíz a la inoculación, pero no en la dinámica de colonización de las bacterias. La sobrevivencia y colonización de las bacterias en el suelo no esterilizado fue limitada por la ausencia de raíces de maíz, y no por el contenido de materia orgánica.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General.**

Determinar la eficiencia de la inoculación de hongos MVA y *Azospirillum* en el rendimiento de grano y desarrollo de cultivos de maíz (*Zea mays*) de Villa Victoria y Villa de Allende, Estado de México.

### **Objetivos Específicos.**

Determinar algunas propiedades del suelo (densidad, espacio poroso, textura, humedad, pH, materia orgánica, fósforo aprovechable y nitrógeno total).

Determinar la relación entre el porcentaje de colonización de hongos MVA en plantas de maíz (*Zea mays*) con la edad de la misma.

Determinar el efecto de la doble inoculación, hongos MVA y *Azospirillum*, sobre el desarrollo de la planta (altura de la parte aérea, y peso fresco de la raíz).

Cuantificar el número de esporas presente en el suelo, en las temporadas seca y lluviosa.

Cuantificar el porcentaje de nitrógeno y fósforo foliar de cultivos de maíz en los diferentes tratamientos.

Determinar el rendimiento del cultivo de maíz, en los diferentes tratamientos (inoculados y fertilizados).

## **SUPUESTO E HIPÓTESIS**

Si se considera que: 1) la simbiosis micorrízica favorece la absorción de fosfatos y otros elementos nutrimentales, la retención de humedad, previene el ataque de plagas a las plantas; y 2) las bacterias *Azospirillum* fijan nitrógeno atmosférico que las plantas pueden absorber rápidamente y liberan hormonas de crecimiento mejorando el desarrollo total de la planta. Se plantea la hipótesis de que, la doble inoculación en plantas de maíz favorece la absorción de nutrimentos (N y P) y su desarrollo, lo que se ve reflejado en el rendimiento del cultivo.

---

## DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

### **Localización.**

El área de estudio forma parte del distrito de temporal número 80 de Valle de Bravo, Edo. de México; el sitio Ejido Las Peñas, Villa Victoria, está ubicado en 100° 04' 37.71 de longitud oeste y 19° 28' 47.03 de latitud norte, y Las Mesas de Zacango, Villa de Allende, se encuentra en 100° 05' 39.43 de longitud oeste y 19° 21' 11.35 de latitud norte (fig. 12). Ambas zonas presentan áreas agrícolas, forestales y pecuarias.

Las Peñas colinda con los siguientes poblados: al norte con La Presa, al sur con Dolores Vaquería, al este con Cerritos del Pilar y al oeste con Loma de Juárez. Por su parte, Las Mesas de Zacango colinda con: Agua Escondida al norte, Las Mesas de San Martín al sur, San Miguel al este y Los Venados al oeste. Todos poblados pertenecientes al Estado de México.

### **Geología.**

El área de estudio se localiza dentro de la subprovincia fisiográfica de Mil Cumbres, siendo una región accidentada por la diversidad de sus geoformas que descienden, hacia el sur, lomeríos, mesetas y colinas redondeadas. En esta subprovincia la estratigrafía se compone de afloramientos de rocas triásicas, las cuales litológicamente se clasifican como filitas y pizarras del cretáceo, afloran rocas sedimentarias cálcicas del terciario y cuaternario, y rocas volcánicas cenozoicas.

### **Suelos.**

Los suelos del área de trabajo son del grupo ando, éstos van de una acidez moderada a fuerte. (Worten y Aldrich, 1980 ) El nombre de andosol deriva del japonés *an*-oscuro y *do*-suelo, suelos formadores de materiales ricos en vidrio volcánico. Presenta propiedades ándicas a una profundidad de 35 cm. o más y tiene un horizonte A mólico o A úmbrico descansado, posiblemente, sobre un B cámbrico o un A ócrico y un B cámbrico; carecen de las propiedades de diagnóstico de los vertisoles; carecen de propiedades sálicas (Ortiz *et al.*, 1990).



***Clima.***

Según la clasificación de Köpper modificada por García (1981), a esta zona le corresponde un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (CW). Los meses más fríos del año son: diciembre, enero y febrero, durante los cuales se registran heladas cuya intensidad aumenta en algunas ocasiones, y en consecuencia, durante las primeras horas de la mañana se observan montones de escarcha que cubren parcialmente la vegetación. Las temperaturas mínimas oscilan entre -3 a -5 °C mientras que las máximas alcanzan valores de 20 °C.

***Vegetación.***

Contreras y Melo (1974) reconocen bosques de pino, de encino, de pino-encino; regiones donde predominan gramíneas, arbustos, hierbas y lugares donde existen individuos de todos los estratos. Además reportan un listado florístico que se compone de 51 familias y 114 especies.

Los principales cultivos que se presentan en el área de estudio, en condiciones de temporal son: maíz y en menor escala, avena, cebada y trigo.

## MATERIAL Y MÉTODO

### *Fase de gabinete.*

Esta consistió de la búsqueda bibliográfica sobre endomicorizas (morfología, función, respuesta de los cultivos a la inoculación, etc.), *Azospirillum* (bioquímica, fisiología, colonización, función, etc.), maíz (adaptación, descripción botánica, utilización e importancia), Andisoles (propiedades y sus efectos sobre los cultivos) también se hizo una consulta cartográfica del área de estudio para conocer la localización, vegetación, orografía, hidrología, edafología, clima y uso del suelo. Además de consultar técnicas y métodos microbiológicos.

### *Fase de campo.*

En la presente fase se hizo un recorrido por la zona Villa Victoria y Villa de Allende, Edo. de México, para elegir los sitios de muestreo, teniendo como criterios la presencia de maíz (*Zea mays*)

Posteriormente, se realizó la toma de muestras de suelo, con la finalidad de determinar las propiedades con mayor influencia sobre el rendimiento de las cosechas. Para el caso de parcelas -que según Jackson (1982) son áreas mínimas de un campo que reciben, independientemente, un determinado tratamiento y son cultivadas como una unidad- se tomaron muestras compuestas. Para dicha acción se realizó un recorrido en zig-zag a través de la parcela, reuniendo de 3 a 5 muestras parciales de 100-200 g. con las que se formó una muestra única de suelo, para un solo tratamiento. Cada submuestra fue extralada de la capa arable (aproximadamente de 20 a 30 cm de profundidad), ya que a esta distancia es a la que generalmente llegan las raíces y donde se encuentra la mayor actividad microbiana, (Jackson, 1982). Una vez obtenida la muestra compuesta totalmente homogeneizada se tomaron 2 Kg de suelo, para los posteriores análisis físicos y químicos

Antes de la siembra se encaló el suelo de ambos sitios; para conocer los requerimientos de cal, se incubaron algunas muestras de suelo con diferentes dosis de la misma, según el método de incubación (Aguilar, 1987). Las cantidades que registraron un aumento en el pH de aproximadamente una unidad fueron: 1.5 ton/ha. en Las Peñas y 1.0 ton/ha. en Las Mesas estas aplicaciones se hicieron antes de la siembra con el fin de que el suelo tuviera el tiempo suficiente para neutralizarse con el suelo, el método fue al voleo y revuelta con el suelo por tracción mecánica (tractor) en Las Peñas y tracción animal (yunta) en Las Mesas.

En todas las unidades experimentales, de ambos sitios, se aplicó abono orgánico en una proporción de 1000 Kg/ha, por lo que se prepararon, aproximadamente, 150 Kg. de composta (anexo) para cada sitio y con los materiales que se encontraron en cada uno. En Villa Victoria se utilizó hojarasca de pino y en menor cantidad, de encino, estiércol de vacuno y desperdicios de comida; para Villa de Allende se empleó hojarasca de encino, paja, estiércol de vacuno y desperdicios de comida. Se elaboraron en capas, agregándose agua y los activadores (mezcla de bacterias fermentadoras), y superfosfato triple de calcio, cada que se terminaba un piso; al final se cubrió con un hule negro y regó diariamente durante una semana, y después una vez a la semana, (Trueba, 1996).

El diseño experimental de campo fue de tipo factorial, con 13 tratamientos (tabla 2) y 3 repeticiones, distribuidas completamente al azar en 39 unidades experimentales, (Reyes, 1992) y en dos sitios diferentes. El área de cultivo en cada sitio midió, aproximadamente 850 m<sup>2</sup>, cada unidad ocupó 15 m<sup>2</sup>, por lo que se tuvieron 45 m<sup>2</sup> de cada tratamiento.

**Tabla 2.** Arreglo de los tratamientos aplicados a cultivos experimentales de maíz en los ejidos de Las Peñas y Las Mesas de Zacango, Estado de México

Tratamiento	Características	Parcelas
Testigo	Altamente fertilizado	37,38,39
M-80	Micorrizado, 80 Kg/ha de N	12,28,33
M-80-40	Micorrizado, 80 Kg/ha de N y 40 Kg/ha de P	2,7,20
M-80-60	Micorrizado, 80 Kg/ha de N y 60 Kg/ha de P	23,25,27
A	<i>Azospirillum</i>	1,5,24
A-0-40	<i>Azospirillum</i> y 40 Kg/ha de P	4,9,36
A-0-60	<i>Azospirillum</i> y 60 Kg/ha de P	8,32,34
M-A	Micorrizado y <i>Azospirillum</i>	10,11,18
M-A-0-40	Micorrizado, <i>Azospirillum</i> y 40 Kg/ha de P	22,28,31
M-A-0-60	Micorrizado, <i>Azospirillum</i> y 60 Kg/ha de P	15,16,30
80	80 Kg/ha de N	21,29,35
80-40	80 Kg/ha de N y 40 Kg/ha de P	6,13,19
80-60	80 Kg/ha de N y 60 Kg/ha de P	3,14,17

Las variables en el diseño fueron: 1) el sitio (Las Peñas: agricultura mecanizada, de temporal y uso desmedido de fertilizantes, herbicidas e insecticidas. Las Mesas de Zacango: agricultura de tracción animal, de temporal y uso abundante de fertilizantes), 2) con y sin inóculo de hongos MVA y *Azospirillum*, 3) dosis de fósforo (superfosfato triple de calcio) 0, 40 y 60 Kg/ha., y 4) dosis de nitrógeno (0 y 80 Kg/ha. de urea).

Antes de la siembra se midieron y marcaron las unidades experimentales con troncos pintados de color amarillo. La siembra se realizó a golpe, es decir, aplicando de 5 a 6 semillas cada 30 cm., aproximadamente. Se abrieron los surcos dejando una distancia de 60-70 cm. entre uno y otro, (Guerrero, 1981).

Para ambos sitios se necesitaron 30 kg de semilla por hectárea para obtener una densidad de aproximadamente 50 mil plantas/ha, (Tocagni, 1980). La semilla que se sembró fue la misma que emplean los agricultores de cada sitio; para los tratamientos que requerían inoculación se aplicó un inóculo de multicepas de hongos micorrizicos y/o *Azospirillum* (donación *Nocor*), el primero se preparó diluyendo 1 ml de éste en 1000 ml de agua destilada y 1 mg de molibdato de amonio como activador, al segundo sólo se le aplicó agua destilada; las semillas se mojaron (de 1 a 2 hrs.) en dichas mezclas antes de ser sembradas (Trueba, 1995).

La fertilización con urea se realizó en dos diferentes fechas. La mitad de ella se agregó con el abono orgánico el día en que se sembró; la segunda parte se adicionó en la segunda escarda.

Se tomaron muestras del suelo para determinar la población de esporas en el mismo, por lo que se procedió a sacudir el suelo de la rizósfera adherido a la raíz cuando la planta se colectó; pero cuando no, el procedimiento a seguir fue el siguiente: eliminar la vegetación o residuos vegetales de la superficie del suelo, hacer un hoyo de aproximadamente 20 cm. de diámetro por 30 cm. de profundidad, auxiliarse de una pala pocera, en seguida colectar suelo de las paredes del pequeño pozo con una palita de jardinero. Dichas muestras se conservaron en bolsas de plástico y a bajas temperaturas (4-10 °C) hasta su procesamiento. (Ferrera *et al.*, 1993). La toma de muestras se realizó en dos temporadas: seca y lluviosa.

Después de la siembra, se midió cada 15-20 días, la altura de 5 plantas de maíz (elección al azar) por parcela y muestreada su raíz cada 30 días. El material radical fue lavado y pesado para su posterior análisis en laboratorio.

En cuanto a la toma de muestras radicales de maíz se tomaron 3 plantas por unidad experimental, obteniendo un total de 9 para cada tratamiento. Es recomendable extraer con mucha precaución el sistema radical, para no causarle daños mecánicos, como la pérdida de raicillas que afectan los resultados de porcentajes de colonización. Las muestras radicales empleadas para la observación de hongos micorrizicos se fijaron en solución FAA (anexo) (Ferrera *et al.*, 1993) y se transportaron en botellas de vidrio, (Gómez y Rodríguez, 1977). Las utilizadas para observar *Azospirillum* se trasladaron con algo del suelo del que las rodea, en botellas de vidrio y a bajas temperaturas, aproximadamente 5°C (Gómez y Corlay, 1993). Las partes aéreas fueron medidas con cinta métrica.

Al transcurrir aproximadamente 60 días, cuando las plantas de maíz alcanzaron los 30-40 cm de longitud, se realizó la primera escarda (Guerrero, 1981). En la segunda, se aplicó la última mitad de fertilizante, para lo cual se abrió un pequeño surco a un lado de las plantas, se agregó éste y finalmente se tapó con suelo.

Cuando las plantas llegaron a la floración (jilote), que comprende el cuarto y quinto mes de edad, se colectó la hoja opuesta inferior a la flor femenina de 5

plantas escogidas al azar por parcela para determinar la acumulación de N y P foliar (Chapman, 1979).

La cosecha se realizó en la etapa de madurez de las plantas (aproximadamente 6.5 meses después de la siembra). Se colectaron y contaron todas las mazorcas obtenidas en los surcos centrales (2 y 3) sin descartar golpes cabezales de cada parcela, se eliminaron los surcos 1 y 4 para evitar el efecto de borde (CIMMYT, 1986). De los elotes cosechados se tomaron 5 al azar y se les pesó: en fresco y en seco (secado al sol durante 10 días) y el grano seco (desgranados manualmento) para calcular el rendimiento de grano seco en t/ha.

### Fase de laboratorio.

Al suelo se le determinaron algunas propiedades físicas y químicas (tabla 3). También se cuantificó el número de esporas por el método de Tamizado-decantado (Sieverding, 1983), en el cual se hace pasar el suelo con agua por varios tamices (anexo).

**Tabla 3.** Propiedades físicas y químicas del suelo determinadas en los ejidos de Las Peñas y Las Mesas de Zacango

PROPIEDAD	MÉTODO	FUENTE
Densidad Aparente	De la probeta	Gandoy, 1991
Densidad Real	Del picnómetro	Gandoy, 1991
% Espacio Poroso	Relación DA-DR	Foth, 1992
% Humedad	Diferencia de pesos	Foth, 1992
Textura	Bouyocus	Foth, 1992
pH activo	Relación 1:2.5 agua	Jackson, 1982
pH potencial	Relación 1:2.5 KCl 1M	Jackson, 1982
Materia Orgánica	Walk y Black	Ruiz, 1979
Fósforo aprovechable	Trougg	Grande, 1974
% Nitrógeno	Microkjeldhal de Gunning	Ruiz, 1979

En las muestras radicales se realizó el reconocimiento de estructuras de hongos MVA por el método de tinción de raíces de Phillips y Hayman, (citado en Ferrera, 1993) que consiste de un clareo, blanqueo, acidificación, tinción y decoloración (anexo) y su porcentaje de colonización por las siguientes fórmulas:

$$\text{Porcentaje de colonización total} = \frac{\text{número de segmentos colonizados} \times 100}{\text{número de segmentos totales}}$$

$$\text{Porcentaje de colonización vesicular} = \frac{\text{número de segmentos con vesículas} \times 100}{\text{número de segmentos totales}}$$

$$\text{Porcentaje de colonización arbuscular} = \frac{\text{número de segmentos con arbuscúsculos} \times 100}{\text{número de segmentos totales}}$$

También se aislaron y observaron las bacterias fijadoras de nitrógeno, *Azospirillum*, por el método de Aislamiento a partir de raíces (Gómez y Corlay, 1993) que consiste de un lavado, desinfectado, siembra de las raíces en el medio (semisólido) Nfb (anexo) y observación al microscopio.

A las hojas de las plantas de maíz colectadas en la temporada de floración se les determinó, por los métodos de microkjeldhal (Ruiz y Ortega, 1979) y azul de molibdeno (Chapman, 1979), la acumulación de N y P foliar, respectivamente.

Finalmente, a los resultados experimentales se les aplicó una prueba de significancia estadística (Prueba de Tukey) con un límite de error del 5%. El procedimiento consistió en calcular un valor teórico común o diferencia mínima significativa (Reyes, 1992) mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$D = qS_x$$

donde  $S_x$  = error estándar de la media

$q$  = valor tabular, que es un valor de  $t$  modificado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 4 se observan los datos de las propiedades físicas y químicas del suelo de los ejidos de Las Peñas y Las Mesas de Zacango. Los valores de densidad real (2.12 a 2.39 g/cc) indican que se trata de suelos humíferos y ligeros (Gaucher, 1971). Por otra parte, la DA (0.75 a 0.86 g/cc) está muy relacionada con el espacio poroso, los porcentajes de este (de 63.92 a 63.96%) muestran que son suelos muy sueltos y porosos (Foth, 1992), tal como se reporta para estos suelos, reportados como Andosoles.

La consulta cartográfica indicó que se trataba de suelos con textura arenolimoso y de origen volcánico, cuya principal característica es la presencia de altos contenidos de alófono en su fracción arcillosa, lo que ocasiona bajos porcentajes de P asimilable (Black, 1975), ambos datos (textura y P asimilable) coincidieron con lo que se esperaba.

Por otra parte, el pH de los sitios donde se trabajó es muy ácido (de 4.53 a 5.56), esto puede deberse al alto porcentaje de materia orgánica que durante su descomposición produce ácidos carboxílicos y fenólicos desprendiendo iones de hidrógeno (Foth, 1992). Además, los Andosoles derivan de Andesitas y Riolitas entre otros tipos de rocas que son de tendencia ácida.

Los datos de contenido de materia orgánica variaron entre 7.70 y 8.59%, lo que indica que se trata de suelos extremadamente ricos (Moreno, 1978), debido a que los materiales amorfos como alófonos fijan aniones y forman complejos con los ácidos orgánicos lo que dificulta su descomposición y provoca una acumulación de materia orgánica (Cajuste, 1977).

**Tabla 4.** Propiedades físicas y químicas del suelo cultivado con maíz en los ejidos de Las Peñas y Las Mesas de Zacango, Estado de México.

Propiedades	Las Peñas	Las Mesas
DR (g/cc)	2.39	2.12
DA (g/cc)	0.86	0.75
% EP	63.96	63.92
Textura	Areno-Limoso	
pH activo	4.53	5.56
pH potencial	4.07	4.76
% MO	7.70	8.59
Fósforo (ppm)*	7.50	1.75
% Nitrógeno	0.12	0.13

DR: densidad real, DA: densidad aparente, % EP: porcentaje de espacio poroso, % MO: porcentaje de materia orgánica.  
\* Método Trougg (Grande, 1974)

Respecto al contenido de fósforo asimilable en el suelo, es bajo según la clasificación de la SCSA (1987) ya que los valores fluctúan entre 1.75 y 7.50 ppm. Esto se debe en parte a que en suelos ácidos el complejo de intercambio contiene apreciables cantidades de aluminio adsorbido y pequeñas pero significativas cantidades de hierro y manganeso que, al combinarse con los fosfatos forman compuestos insolubles de aluminio, hierro y quizá manganeso. Los compuestos resultantes son precipitados de la solución o adsorbidos en la superficie de los óxidos de aluminio y de hierro o en las partículas del suelo (alófanos). La acidez tiende a contener más hierro y aluminio, así los productos de la fijación del fósforo son principalmente fosfatos complejos de estos metales (Tisdale, 1988)

El suelo de estos sitios es medianamente rico en Nitrógeno total (0.12 a 0.13%) según Moreno (1978) debido al alto contenido de materia orgánica, ya que ésta contiene en promedio un 5% de N y 58% de C (Cajuste, 1977). Tanaka (1980) señala que cuando este tipo de suelos se abren por primera vez al cultivo, la materia orgánica comienza a mineralizarse y a suministrar nitrógeno a los cultivos, sin embargo, después de varios años, dependiendo de la intensidad de explotación, disminuye la cantidad de nitrógeno, llegando inclusive a la deficiencia.

Las determinaciones de las propiedades antes mencionadas coinciden con las principales características de un andisol, tanto para el suelo de Las Peñas como para el de Las Mesas de Zacango.

Molina (1997) reporta a los municipios de Villa Victoria y Villa de Allende, como los de mayores deficiencias nutrimentales en la subprovincia de Mil Cumbres, debido a la sobreexplotación del suelo, pues presenta topografías poco accidentadas, por lo que se vuelven suelos adecuados para la producción agrícola. Además por presentar una alta capacidad de retención de humedad, debido a la gran superficie específica de alófano y al amplio contenido de materia orgánica, permite a los agricultores sembrar con la humedad residual (Vergara, 1992).

La tabla 5 muestra los resultados de los pH's, fósforo aprovechable y contenido de nitrógeno del suelo antes y después de la aplicación de cal. En ambos ejidos los valores de pH aumentaron aproximadamente en media unidad. En base a estos resultados el encalado no aumentó considerablemente el pH(s), pero tal vez si logró disminuir la degradación química, provocada por el porcentaje de saturación con aluminio e incrementar la productividad del

**Tabla 5.** Propiedades del suelo determinadas antes y después del encalado aplicado en los sitios de siembra de Las Peñas y Las Mesas de Zacango, Estado de México.

Sitio	Propiedad	Antes	Después
Las Peñas	pH activo	4.62	5.02
	pH potencial	4.01	4.94
	Fósforo (ppm)*	8.75	7.88
	% Nitrógeno	0.11	0.03
Las Mesas	pH activo	5.65	6.08
	pH potencial	4.91	5.21
	Fósforo (ppm)*	8.31	9.80
	% Nitrógeno	0.02	0.15

\* Método Trougg (Grande, 1974).

suelo, reflejándose en un rendimiento mayor del maíz (López y Aguilar, 1990). En Las Peñas disminuyeron los contenidos de P aprovechable y N total. En cambio, se encontró una mayor cantidad de éstos elementos en el suelo de Las Mesas. Esto sucede principalmente porque en los suelos ácidos el fósforo es fijado por el hierro y el aluminio solubles y así el encalado reduce la solubilidad de ambos, reteniendo menor cantidad de este en formas insolubles e inobtenibles (Tamhane *et al.*, 1986).

**Tabla 6.** Características de las zonas de trabajo.

Propiedades	Las Peñas	Las Mesas
pH	ácido	ligeramente ácido
P (ppm)	deficiente	bajo
% N	medianamente rico	medianamente rico
Estructura	deteriorada +++	deteriorada +
Plagas	tusas, frailecillos	ninguna
Manejo	tracción mecánica	tracción animal
Uso de agroquímicos	+++	+

Diversos factores pueden afectar el desarrollo y sobrevivencia de los hongos endomicorrízicos, dentro de los más importantes, se encuentran las prácticas agrícolas, particularmente la adición de fertilizantes, pesticidas y manejo del suelo (González y Ferrera, 1989). Así, los sitios de trabajo fueron escogidos por el contraste en algunas propiedades del suelo (tablas 4 y 5) así como por su manejo (tabla 6). En Las Peñas el manejo es mecanizado, el uso de agroquímicos y número de plagas es mayor que en Las Mesas de Zacango, así la estructura del suelo se aprecia más deteriorada en el primer ejido que en el segundo. Sin embargo, en ambos se encontraron hongos MVA y bacterias *Azospirillum* nativos.

La tabla 7 muestra los porcentajes de P en planta. Todos los tratamientos de Las Peñas presentaron niveles deficientes (menores a 0.11% según Etchevers, 1985) debido a que el suelo tiene bajos contenidos de P asimilable (tabla 4). Sin embargo, sobresalieron (con rangos de 0.022 a 0.021%) los tratamientos con fertilización química de P: M-80-40, M-A-0-60, M-A-0-40, 80 y A-0-60, estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos (apéndice, tabla A). De estos, M-80-40, M-A-0-60 y 80 lograron el 100% de colonización total en la floración (153 dds), lo que indicaría que fueron los hongos MVA los responsables del mayor porcentaje de fósforo, sin embargo, los datos de colonización no muestran el grado de eficiencia de los mismos. También pudo favorecer la absorción de fósforo a la planta, la actividad de *Azospirillum* como productor de hormonas esenciales para el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas hospederas (Weier, 1980). Por otra parte, el porcentaje de N foliar, considerada como alta cuando es mayor a 3.50% (Etchevers, 1985), se vio favorecida en M-80, A-0-60 y A (de 4.5 a 3.8%), iguales estadísticamente (apéndice, tabla B). Esto puede explicarse por las actividades de: 1) *Azospirillum* fijando N atmosférico y produciendo hormonas (Bashan *et al.*, 1996), 2) los hongos endomicorrízicos transportando N asimilable a la planta (Johansen *et al.*, 1994) o 3) la planta misma absorbiendo nutrientes.

Al igual que las plantas de Las Peñas, las de Las Mesas (tabla 7) presentaron deficiencia en el porcentaje de P foliar (según Etchevers, 1985), los tratamientos A, 80-40, A-0-40 y M-80 registraron, estadísticamente (apéndice, tabla G), el mayor porcentaje, de 0.019 a 0.017%. Para los tratamientos que no fueron fertilizados químicamente con P, consideramos que las micorizas, al explorar mayores volúmenes de suelo mayores con sus redes hifales, captaron más P asimilable para la planta. Se presentó una cantidad de N, significativamente mayor (apéndice, tabla H), en los tratamientos M-80-40, 80-40 y A-0-60 (3.40 a 3.15%), considerados como niveles suficientes por estar en el rango de 2.61 a 3.50 (Etchevers, 1985). Para el caso de A-0-60 la fijación de N por *Azospirillum* sustituyó la aplicación de urea y la aplicación de cal que aumentó la obtenibilidad de nitrógeno al apresurar la descomposición de materia orgánica (Tamhane *et al.*, 1986).

En ambos cultivos se presentaron deficiencias de P foliar (Etchevers, 1985), sin embargo las plantas no mostraron hojas o tallos purpúreos, ni madurez o desarrollo lento, pero algunas parcelas (80,40 de Las Peñas y M,80 de Las Mesas de Zacango) presentaron tallos delgados, señal de deficiencia de fósforo (Foth, 1992).

**Tabla 7.** Porcentaje promedio de P y N en plantas de maíz de Las Peñas y Las Mesas de Zacango.

Tratamiento	Las Peñas		Las Mesas	
	P foliar (%)	N foliar (%)	P foliar (%)	N foliar (%)
80	0.020	3.01	0.016	2.88
80-40	0.016	3.47	0.019	3.24
80-60	0.018	1.92	0.011	2.25
M-80	0.003	4.55	0.017	2.56
M-80-40	0.022	2.82	0.013	3.40
M-80-60	0.013	2.77	0.016	2.37
A	0.005	3.78	0.019	2.72
A-0-40	0.015	2.64	0.018	2.18
A-0-60	0.020	3.89	0.013	3.15
M-A	0.019	1.90	0.015	2.04
M-A-0-40	0.021	2.45	0.015	1.75
M-A-0-60	0.022	2.50	0.013	1.63

A continuación se presentan, para cada sitio, los resultados y discusión a cerca del desarrollo de las plantas de maíz, en relación a las inoculaciones de hongos MVA y *Azospirillum*, y su repercusión en los rendimientos de grano seco.

## Las Peñas, Villa Victoria

En la figura 10 se observan los porcentajes de colonización micorrízica total en las cuatro fechas de toma de muestras: 20, 50, 90 y 153 días después de la siembra (dds).

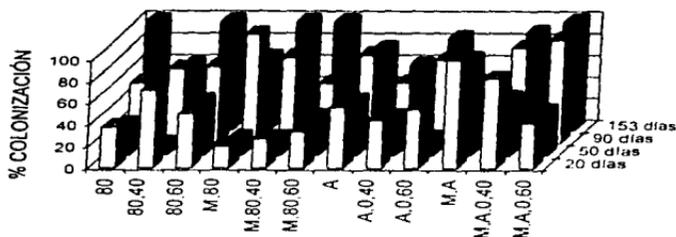


Figura 10. Promedio de los porcentajes de colonización micorrízica total en plantas de Las Peñas.

Inicialmente (los dos primeros meses), estos valores fueron bajos (inferior al 60%), aumentando en las últimas etapas de desarrollo del maíz. Por otra parte, las propiedades (tabla 4) y manejo (tabla 6) afectaron las condiciones del suelo (pobre en P aprovechable, y muy suelto), aún después de que el pH subió en media unidad con el encalado (5.02), el suelo no logró llegar al óptimo (pH 6.5-7.5) para facilitar la solubilidad del fósforo (y de otros elementos), por lo que la inhabilidad de ciertas plantas no micorrizadas para absorber este nutrimento cuando su disponibilidad es baja, puede ser la principal causa de detención del crecimiento, más que el efecto directo de la acidez o alcalinidad sobre el sistema radical. Además del genotipo del hospedante, el contenido inicial de fósforo de un suelo dado es un factor determinante de la respuesta a la micorrización, (Guzmán y Ferrera, 1990). Maehara *et al.* (1993) encontró que en suelos ácidos se retarda la formación micorrízica, es por esto que pensamos que hubo bajos porcentajes de colonización micorrízica total (fig. 10) en todos los tratamientos en las dos primeras fechas de muestreo, también pudieron influir los restos de productos químicos (herbicidas e insecticidas) empleados en cultivos anteriores.

En general, los mayores porcentajes de colonización micorrízica total los obtuvieron los tratamientos M-A-0-40, M-A-0-30, M-A y 80-60, posiblemente esto se debe a que la presencia del inóculo de *Azospirillum* favoreció el aporte de N

asimilable requerido por los hongos endomicorrizicos, o que *Azospirillum* estimuló la colonización micorrizica en las plantas de maíz (Barea *et al.*, 1983) al producir ácido abscísico el cual es un factor benéfico en la colonización del hongo MVA (Fyson y Oaks, 1992). Se ha demostrado que la actividad de los microorganismos en la rizósfera afecta decisivamente el comportamiento de la simbiosis micorrizica (Azcón y Barea, 1980), la inoculación mixta con *Azospirillum* y hongos MVA origina una interacción sinérgica, obteniéndose un incremento significativo en crecimiento y acumulación de fósforo en plantas. Esta doble inoculación podría reemplazar la aplicación de fertilizantes de nitrógeno y fósforo (Al Nahidh y Gomah, 1991) y promover la interacción de hongos MVA en las plantas. Para el caso del tratamiento 80-60, se registró la colonización de hongos MVA nativos que se vio favorecida por la aplicación de la urea.

Los tratamientos inoculados presentaron los porcentajes de colonización más altos (fig. 10), dado que las cepas de hongos micorrizicos introducidos fueron más infectivas que las cepas nativas, pese a que estas se vieron en desventaja por no estar adaptadas a las condiciones bióticas de dicho suelo.

La mayor altura de la planta (fig. 11) se observó en los tratamientos sin P químico: M-80 y 80 con 255 y 235 cm. (estadísticamente iguales, apéndice, tabla C), hecho que se atribuye a la aplicación de N (urea) que favoreció el crecimiento y la velocidad del mismo (Rodríguez, 1992). Aunque no hay que descartar las actividades de los simbiontes nativos, *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal mediante: a) fijación de nitrógeno, lo cual contribuye con nitrógeno a la planta, b) efectos hormonales, los cuales promueven el metabolismo y crecimiento vegetal, c) incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, lo cual puede estar relacionado con cambios hormonales y que origina una mayor capacidad de absorción de agua y minerales, d) alteración del funcionamiento de la membrana por

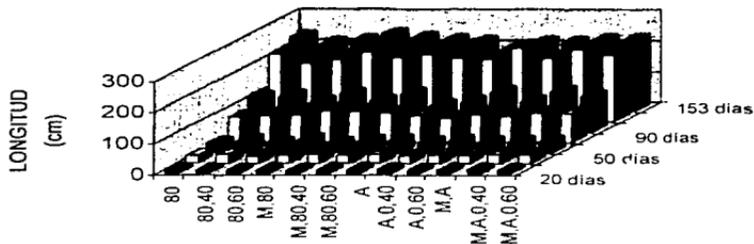


Figura 11. Altura promedio de la parte aérea de las plantas en Las Peñas.

medio de moléculas de comunicación celular (Bashan *et al.*, 1996). Por su parte, los hongos MVA, a través de sus hifas toman el nitrógeno desde fuentes inorgánicas de amonio, incrementan el volumen del suelo explorado para la captación de nutrimentos, aumentan la eficiencia de absorción de los mismos desde la solución del suelo e incorporan metabolitos en los procesos de digestión y degeneración de las estructuras del mismo en las células de la raíz (Sieverding, 1991).

El peso fresco promedio de la raíz del maíz (determinado en las muestras de las tres últimas fechas) esta representado en la figura 12 para el municipio de Villa Victoria.

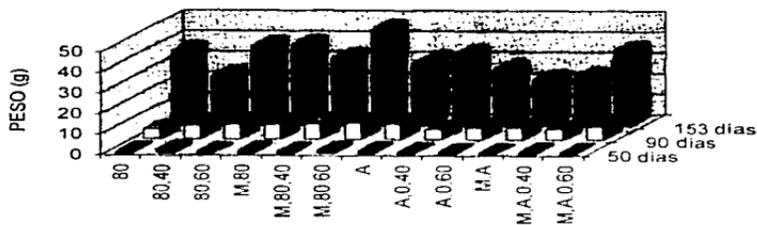


Figura 12. Peso promedio de la raíz de las plantas en Las Peñas

Aquí se observa que las plantas con el mayor valor fueron las fertilizadas con P y N, M-80-60, 80-60 y A-0-40 (54 a 37 g), sin diferencia estadística significativa (apéndice, tabla D). Teniendo en cuenta que todos los tratamientos presentaron la doble infección (por la presencia de endofitos nativos), consideramos que tanto *Azospirillum* favoreció el desarrollo radicular por su generación de hormonas estimulantes del crecimiento (Fulchieri *et al.*, 1993) como los hongos VAM al inducir mayores ramificaciones (Sieverding, 1991), o bien que los endofitos introducidos son tan eficientes como los nativos.

#### Las Mesas de Zacango, Villa de Allende

En la figura 13 se observan los porcentajes de colonización micorrízica total para las plantas del ejido de Las Mesas, las fechas para la toma de muestras fueron 14, 50, 110 y 170 dds.

En esta se observa que el establecimiento de la infección MVA fue rápida ya que desde el primer muestreo los porcentajes de colonización total fueron altos (superiores al 50%) y así se mantuvieron durante todo el desarrollo del maíz, posiblemente debido a que las bajas cantidades de P en el suelo favorecen los porcentajes de colonización micorrizica (Miranda y Harris, 1994), además de que se ha observado que con la aplicación de composta de estiércol y residuos de plantas, las raíces son intensamente colonizadas (Brechelt, 1988 citado en Sieverding, 1991). Cabe mencionar que la calidad de la composta es importante para la formación óptima de las MVA (Sieverding, 1991). También pudo influir el manejo del suelo (tabla 6), tracción animal, bajo empleo de fertilizantes y nulo de herbicidas (Gavito y Varela, 1990).



Figura 13. Promedio de los porcentajes de colonización micorrizica total en plantas de Las Mesas de Zacango

El mayor promedio lo obtuvieron los tratamientos M-A-0-60, A-0-40, M-A y M-A-0-40, cuya característica es la presencia del inóculo de *Azospirillum* y la ausencia de urea, posiblemente esto se debe a que los hongos V-A (nativos o introducidos) se ven favorecidos por la presencia del inóculo de *Azospirillum* (Al-Nahidh y Gomah, 1991; Azcón y Barea, 1980) y la ausencia del fertilizante químico de nitrógeno.

Es importante mencionar que también los tratamientos M-A-0-40 y M-A sobresalen con los altos porcentajes de colonización micorrizica total en Las Peñas, lo que apoya dicha explicación.

La aplicación del inóculo de hongos micorrizicos arbusculares en este sitio no fue notoria ya que la respuesta de éstas plantas con las no inoculadas fue muy parecida, posiblemente debido a que: 1) las cepas introducidas y las nativas son igualmente infectivas, o 2) las cepas introducidas no resultaron infectivas y las que lograron establecer la infección micorrizica en todos los tratamientos, fueron las cepas nativas.

El encalado resultó favorable ya que el pH aumentó a 6.0 (tabla 5), por estas condiciones, por el manejo y la ausencia de plagas (tabla 6), el crecimiento de la parte aérea de las plantas de maíz fue rápido y uniforme. En la figura 14 se observa, para Las Mesas, la altura promedio de la parte aérea de las plantas de maíz, en cada fecha de toma de muestras.

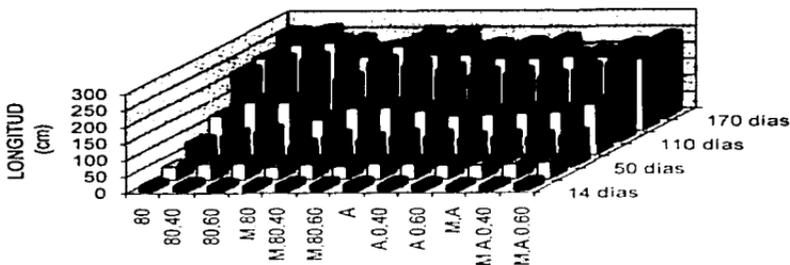


Figura 14. Altura promedio de la parte aérea de las plantas en Las Mesas de Zacango

Los tratamientos M-80-60, 80, 80-60 y 80-40 obtuvieron las mayores alturas (de 270 a 255 cm), sin diferencia estadística significativa entre ellos (apéndice, tabla 1). Las necesidades de N de la planta fueron compensadas por la aplicación de urea, los tratamientos con inoculación de *Azospirillum* no sobresalieron. La actividad de *Azospirillum* puede ser reprimida por la adición de niveles altos de nitrógeno combinado o la excesiva aplicación de fertilizantes nitrogenados (Arsac *et al.*, 1990; Rangel y Vergara, 1989; Mendoza y García-Curcho, 1990), aunque para este ciclo de siembra no se aplicaron grandes dosis, quedaron residuos de los cultivos anteriores.

En todas las parcelas se presentó *A. lipoferum* pero las parcelas doblemente inoculadas se caracterizaron por ser las de menor rendimiento, altura de la planta, peso de raíz y N foliar, posiblemente esto se debe a la competencia que hubo por el área cortical de la raíz entre todos los simbioses, tanto nativos como introducidos (Pocovsky *et al.*, 1985).

El peso fresco promedio de la raíz de plantas (determinado en las muestras de las tres últimas fechas) se representa en la figura 15.

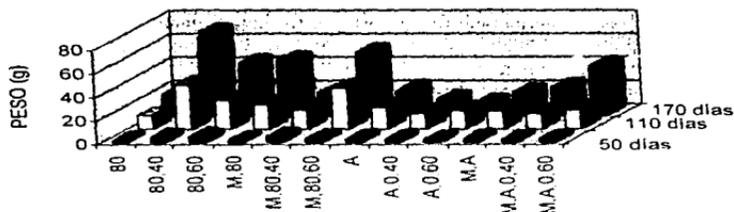


Figura 15. Peso promedio de la raíz de las plantas en Las Mesas de Zacango.

Aquí se observa que fue significativamente alto (apéndice, tabla J) en los tratamientos 80-40, 80-60 y M-80-60 (de 95 a 28 g), los que también sobresalen en altura de la planta (270 a 255 cm) y rendimiento (5.7 a 5.5 t/ha). Estos resultados indican que son más efectivas las cepas nativas, la aplicación de materia orgánica (composta) y las bajas dosis de fertilizante químico (nitrógeno y fósforo) favorecieron su actividad. De igual forma Villarreal *et al.* (1990) encontraron que la inoculación

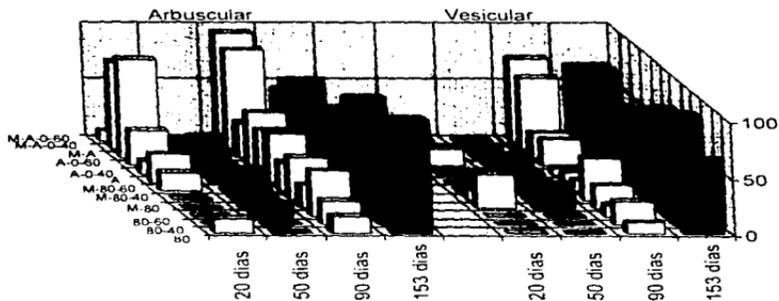


Figura 16. Promedio de los porcentajes de colonización micorrizica arbuscular y vesicular en plantas de Las Peñas.

individual o en forma conjunta no incrementó la producción de biomasa de la parte aérea del trigo, siendo la doble inoculación la que presentó menor cantidad de materia seca, esta misma situación se presentó al determinar peso seco de raíz. Debido a que ambos endofitos (*Azospirillum* y hongo micorrízico *Glomus*) ocupan la misma área cortical en las raíces de las gramíneas colonizadas, se presentaron interacciones directas entre los tres simbiontes (planta-hongo-bacteria), y una competencia por los fotosintatos producidos por el hospedero.

Con el encalado se incrementaron los contenidos de fósforo asimilable y nitrógeno total (tabla 6), esto y la aplicación de composta favorecieron el desarrollo y rendimiento de la planta.

En las figuras 16 y 17 se observan 2 grupos de columnas (en cada gráfico), el primero representa los porcentajes promedio de la colonización micorrízica arbuscular y el segundo, la colonización vesicular. Para ambos sitios observamos que, en las tres primeras muestras radicales (20,30 y 40 dds para Las Peñas y 14,50 y 110 dds para Las Mesas) el porcentaje de colonización micorrízica arbuscular fue más alto que la colonización vesicular, debido a que durante el crecimiento de las plantas de maíz se requiere de la transferencia de metabolitos y nutrientes, principal función de los arbusculos (Guzmán y Ferrera, 1990) Para la última toma de muestras se incrementaron los porcentajes de colonización micorrízica vesicular y disminuyeron los de colonización arbuscular, esto se entiende ya que al llegar la

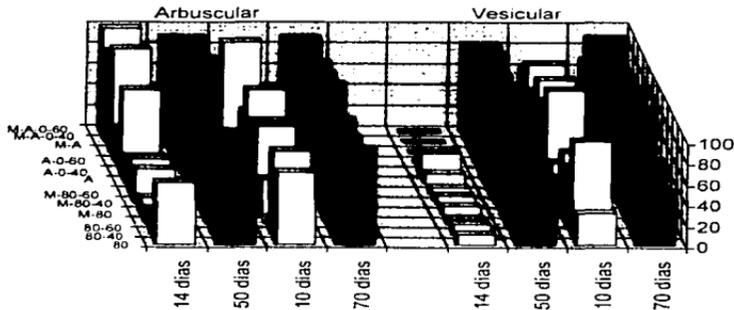


Figura 17. Promedio de los porcentajes de colonización micorrízica arbuscular y vesicular en plantas de Las Mesas de Zacango.

planta a la madurez se reduce su actividad metabólica (Guerrero, 1981), así al decrecer la transferencia de éstos, la formación de arbusculos disminuye y la de vesículas aumenta, pues su principal función es almacenar lípidos que el hongo utiliza durante situaciones de estrés, en este caso para sobrevivir en la etapa final de la planta y poder infectar otra raíz (Sieverding, 1991).

La abundancia de propágulos de hongos MVA puede variar con los períodos de crecimiento de las plantas, el tipo de suelo, genotipo del hospedero y manejo del suelo. Al igual que Gavito y Varela (1993), el número de esporas (fig. 18) aumentó de la temporada seca a la lluviosa, la suma total (de todos los tratamientos) en Las Peñas fue 7500 a 10850 y para Las Mesas de 7500 a 9800, debido a que la humedad edáfica fue determinante en la respuesta a la micorrización, tanto por efectos en el desarrollo radical como por el aumento en la disponibilidad de P en la solución del suelo (Fitter, 1985). Así se favoreció la producción de propágulos por aquellos hongos que lograron establecer nueva la infección. La cuantificación de esporas incluyó tanto a los que quedaron en el suelo como a las recientemente formadas



Figura 18. Número de esporas promedio del suelo de ambos sitios y en las temporadas seca y húmeda.

En ambos sitios se encontraron representantes de los géneros *Glomus* y *Acaulospora*. También observamos que el mayor número de esporas se presentó en Las Peñas, sin embargo no tuvo porcentajes de colonización tan altos como en Las Mesas de Zacango, por lo que pensamos que los propágulos de éste último son más infectivos, debido a que esta zona no está tan perturbada como la primera, la eficiencia de la MVA depende del desarrollo del micelio extrarradical, a mayor abundancia, mejor eficiencia (González y Ferrera, 1989).

El encalado mejoró la actividad microbiológica del suelo (Nurlaeny *et al.*, 1996; Aguilar y López, 1992), favoreciendo el rendimiento (fig. 19) de grano seco (t/ha) en los tratamientos de Las Peñas con inoculación: M-A-0-60, M-80-40, A y M-A-0-40 (17

a 12 t/ha), aunque estadísticamente no hay diferencia significativa entre ellos (apéndice, tablas E y F), observamos que el cultivo se vio favorecido en el porcentaje de N por la actividad de *Azospirillum* y los hongos VAM. Las altas dosis de fertilizante, como las empleadas en el testigo regional (700 kg de sulfato de amonio/ha), no produjeron rendimientos mayores a los obtenidos con 40 y 60 kg de P/ha, por lo que es necesario aplicar P al suelo ya que presenta deficiencias de éste elemento. En Las Mesas de Zacango se registraron dos heladas (en el mes de agosto) hecho que impidió el desarrollo de los jilotes y que por ende, afectó el rendimiento (fig. 19), ya que durante la cosecha se encontraron numerosas mazorcas sin desarrollar, presentaban pocos granos o estos eran muy pequeños. Sin embargo hubo tratamientos (80,40, 80,60 y M,80,60) que obtuvieron los mayores rendimientos (5.7 a 5.5 t/ha) sin diferencia significativa entre ellos (apéndice, tablas K y L). Se observó que las parcelas pertenecientes a estos tratamientos registraron la mayor altura de la parte aérea en la fecha de medición anterior a las heladas (110 dds.), también fueron las primeras en iniciar la floración y posiblemente, por ser las plantas más maduras soportaron dicho fenómeno.

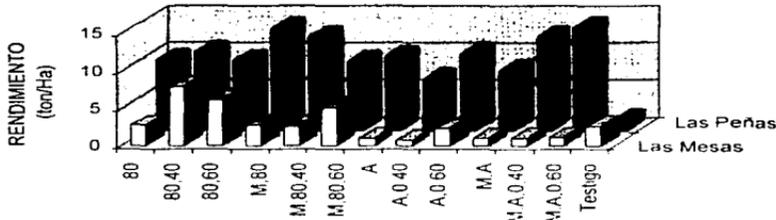


Figura 19. Rendimiento promedio del grano seco de maíz en los dos sitios.

Para facilitar la observación del efecto de los tratamientos sobre las variables, estos se agruparon en: Fertilizados, Inoculados con Micorrizas, Inoculados con *Azospirillum* y Doblemente inoculados, a los que corresponden, respectivamente, los tratamientos 80, 80-40 y 80-60; M-80, M-80-40 y M-80-60; A, A-0-40 y A-0-60; M-A, M-A-0-40 y M-A-0-60. Las tablas 8 y 9 presentan los datos promedio obtenidos en colonización micorrizica total, altura de la parte aérea de la planta, peso fresco de raíz, porcentajes de P y N foliar y rendimiento, determinados (excepto rendimiento) al inicio de la floración, edad en la que la planta tiene la mayor cantidad de nutrimentos para su posterior fructificación.

**Tabla 8. Determinaciones promedio por grupo de tratamientos en Las Peñas**

Tratamiento	*Col. MVA (%)	*Altura (cm)	*Peso raíz (g)	*P foliar (%)	*N foliar (%)	Rend. (t/ha)
Testigo Regional	70	235	41.7	0.022	2.277	1.5
Fertilizados	100	217	37.0	0.017	3.241	9.5
Inoculados Micorrizas	100	227	32.9	0.018	2.792	13.2
Inoculados <i>Azospirillum</i>	80	218	28.3	0.018	3.838	10.1
Doble inoculación	95	228	30.2	0.022	2.475	13.3

\* Determinaciones realizadas en etapa de floración

Todos los tratamientos de Las Peñas tuvieron altos porcentajes de colonización micorrizica total (tabla 8), el testigo regional presentó el valor más bajo, pero los más altos en altura de la parte aérea de la planta, peso fresco de raíz y porcentaje de P foliar, sin embargo, estos no se vieron reflejados en el rendimiento, que fue considerablemente menor (al menos 6 veces) a cualquier tratamiento. En cambio, el testigo de Las Mesas de Zacango (tabla 9) no sobresalió con los datos más bajos ni con los más altos, su rendimiento es igual al de los tratamientos Inoculados con Micorrizas, pero inferior (en un 62%) al de los Fertilizados.

**Tabla 9. Determinaciones promedio por grupo de tratamientos en Las Mesas**

Tratamiento	*Col. MVA (%)	*Altura (cm)	*Peso raíz (g)	*P foliar (%)	*N foliar (%)	Rend. (t/ha)
Testigo Regional	80	215	34.2	0.016	2.851	2.7
Fertilizados	90	250	31.0	0.018	3.063	7.1
Inoculados Micorrizas	90	238	18.6	0.017	2.465	2.7
Inoculados <i>Azospirillum</i>	100	207	14.3	0.019	2.932	0.9
Doble inoculación	78	228	15.8	0.015	1.697	1.0

\* Determinaciones realizadas en etapa de floración

Al observar las tablas 8 y 9 podemos resumir lo siguiente:

- Los tratamientos altamente fertilizados, TESTIGO REGIONAL, no lograron los mejores rendimientos, sin embargo, las altas dosis de fertilizante químico favorecieron el desarrollo radical, registrando los mayores datos en ambos sitios.
- Los FERTILIZADOS obtuvieron mayores cosechas a su respectivo Testigo Regional. Estos tratamientos fueron los de menor altura de la planta y porcentaje de P foliar en Las Peñas, y en Las Mesas, los de mayor altura de la parte aérea, contenido de N foliar y rendimiento.
- La INOCULACIÓN sólo con HONGOS MVA no produjo grandes cambios en el desarrollo de la planta (altura de la planta, peso radical, porcentaje de P y N foliar) pero favoreció el rendimiento en Las Peñas y lo igualó al Testigo Regional en Las Mesas.
- La INOCULACIÓN con *AZOSPIRILLUM* afectó el desarrollo radical, en ambos sitios se registró el valor más bajo, pero favoreció el porcentaje foliar de N en Las Peñas y de P en Las Mesas de Zacango. Pese a que se encontraron bacterias de este género en todas las unidades experimentales, el rendimiento de estos

tratamientos fue considerablemente mayor al del Testigo Regional en Las Peñas, Villa Victoria, y el menor en Las Mesas, Villa de Allende.

- El efecto de la DOBLE INOCULACIÓN fue opuesto; en Las Peñas favoreció el contenido de P foliar y el rendimiento, pero en Las Mesas de Zacango afectó el porcentaje de ambos nutrimentos y el rendimiento, que no difiere mucho del dato menor, obtenido en los tratamientos inoculados sólo con *Azospirillum*.

## CONCLUSIONES

- 1) El suelo de los ejidos de Las Peñas y Las Mesas de Zacango son ácidos, ligeros, extremadamente ricos en materia orgánica y con bajos contenidos de fósforo asimilable, principales características de un Andisol.
- 2) Todas las plantas de maíz de los tratamientos en ambos sitios presentaron infección por hongos MVA y *Azospirillum*, aún los tratamientos que no fueron inoculados, es decir existen simbioses nativos.
- 3) Existe una relación del porcentaje de colonización arbuscular y vesicular con la edad del maíz. Los primeros predominan antes de la madurez de la planta y los segundos durante esta etapa.
- 4) El número de esporas en los dos ejidos aumentó de la temporada seca a la lluviosa. Se encontraron representantes de los géneros *Glomus* y *Acaulospora*.
- 5) El encalado aumentó el pH de ambos sitios, mejorando la actividad microbiológica del suelo, sobre todo en Las Peñas donde se observó mejor la respuesta a la doble inoculación.
- 6) El cultivo de maíz en ambos sitios presentó deficiencias de fósforo foliar y niveles suficientes (en Las Mesas) y altos (para Las Peñas) de N.
- 7) Estadísticamente se obtuvieron las mejores cosechas en los tratamientos M-A-0-60, M-80-40, A, M-A-0-40 de Las Peñas y M-80-60, 80-40, 80-60 para Las Mesas.
- 8) Los rendimientos se vieron favorecidos por la inoculación y la aplicación de P en Las Peñas, y por la fertilización con N y P en Las Mesas de Zacango.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## **RECOMENDACIONES**

En base a nuestros resultados, sugerimos a los agricultores de ambos sitios, algunas técnicas que les permitan eliminar o disminuir el uso de agroquímicos:

- Eliminar el uso de herbicidas y solo realizar dos escardas con tracción mecánica, animal o de forma manual, ya que todas las plantas denominadas "malezas" retienen humedad en el suelo, protegen al cultivo de las heladas y del ataque de algunas plagas.
- Para ambos sitios, aplicar fósforo en dosis de 40 Kg/ha y nitrógeno (80 Kg/ha) sólo en Las Mesas. Elaborar compostas y agregarlas al suelo (al menos 1 ton/ha), ya que estas retienen humedad, sirven de abono, liberan nitrógeno y otros nutrimentos y favorecen la actividad microbiana.

Por otra parte, para ampliar y corroborar la información obtenida en esta investigación, recomendamos:

- Establecer un diseño experimental a nivel de invernadero, con el que se compare la eficiencia de cada endofito, tanto nativos como introducidos.
- Montar un diseño experimental en campo o invernadero, en el que se compare la fertilización química contra la aplicación de abonos orgánicos e inóculos de hongos VAM, *Azospirillum*, etc.
- Repetir esta investigación en sitios que sean deficientes en P asimilable y con otros cultivos.
- Comparar a nivel de campo o invernadero, la eficiencia de los endofitos nativos en diferentes variedades de maíz, criollos usados en la zona e híbridos de alto rendimiento recomendados por INIFAP o CIMMYT.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abbott, L.K. y A.D. Robson. 1985. Fortamion of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 99:245-255.
- Aguilar, A.J.L. y R. López M. 1992. Efecto del encalado sobre el pH, saturación con aluminio y rendimiento de maíz en Andosoles de Naolinco, Veracruz. *Terra* 10(1):75-83.
- Alexander, M. 1990. Introducción a la microbiología del suelo. Edit. AGT Editor D.F., México.
- Al-Nahidh, S y A.H.M. Gomah. 1991. Response of wheat to dual inoculation with V-A mycorrhiza and *Azospirillum*, fertilized with NPK and irrigated with sewage effluent. *Arid Soil Res Rehabil.* 5:83-96.
- Amarasiri, S. L. y S.R. Olsen. 1973. Liming as related to solubility of phosphorus and plant growth in an acid tropical soil. *SSAP.* 37:716-721.
- Andreeva, I.N., K. Mandkhan, T.V. Redkina, E.N. Mishustin y S.F. Izmailov. 1991. Effect of *Azospirillum brasilense* on formation and nitrogen-fixing activity of bean and soybean nodules. *Soviet Plant Physiol.* 38: 646-651.
- Arsac, J.F., C. Lamothe, D. Murlad y J. Fages. 1990. Growth enhancement of maize (*Zea mays*) through *Azospirillum lipoferum* inoculation effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* 10:640-654.
- Azcón, R. y J.M. Barea. 1980. Micorrizas. Investigación y Ciencia. 47:8-16.
- Bakanchikova, T.I., E.V. Lobanok, L.K. Pavlova Ivanova, T.V. Redkina, Z.A. Nagapetyan y A.N. Majsuryan. 1993. Inhibition of tumor formation process in dicotyledonous plant by *Azospirillum brasilense* strains. *Mikrobiologica* (Russian federation) 62:515-523.
- Balandreau, J. 1986. Ecological factors and adaptive processes in N<sub>2</sub>-fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant and Soil* 90: 73-92.
- Bali, M. y K.G. Mukerji. 1991. Interaction between VA mycorrhizal fungi and root microflora of jute. *Dev Agric Manage. For Ecol.* 24: 396-401.
- Barbieri, P., C. Trambaioli, G. Zanetti y E. Galli. 1995. Inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd affects the root system development of *Sorghum bicolor*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetics-physiology-ecology I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds.) NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. G37: 335-340.
- Barea, J., A. F. Bonis y J. Olivares. 1983. Interactions between *Azospirillum*-VA-mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 15:705-709.
- Bashan, Y. 1991. Air-borne transmission of the rhizosphere bacterium *Azospirillum*. *Microb Ecol.* 22: 257-269.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1993. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* 139: 379-385.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1994. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2120-2131.

- Bashan, Y., G. Holguin y R. Ferrera-Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos beneficiosos. I. *Azospirillum*. Terra 14(2):159-194
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1989. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to roots hairs as compared with root surface of wheat. Can. J. Microbiol. 35: 936-944.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-608.
- Bashan, Y., M.E. Puente, M.N. RodríguezM., G. Toledo, G. Holguin, R. Ferrera-Cerrato y S. Pedrín. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Appl. Environ. Microbiol. 61:1938-1945
- Black, C.A. 1975. Relaciones Suelo-Planta. Edit. Hemisferio Sur Buenos Aires, Argentina.
- Burns, R.G. y J.G. Davies. 1986. The microbiology of soil structure. Biol. Agric. & Hort. 3:95-113
- Buwalda, J.G. y K.M. Goh. 1982. Host-fungus competition for carbon as a cause of growth depressions in vesicular-arbuscular mycorrhizal rye grass. Soil Biol. Biochem. 14:103-106
- Cajuste, L.J. 1977. Química de suelos con un enfoque agrícola. Colegio de Postgraduados, UACH. México, México
- Chambers, C.A., S.E. Smith y F.A. Smith. 1980. Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhiza infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. New Phytol. 85: 47-62.
- Chapman, H.D. y P.F. Pratt. 1979. Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Edit. Trillas D.F., México.
- Christiansen-Weniger, C. y J.A. Van Veen. 1991.  $\text{NH}_4^+$ -excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. Appl. Environ. Microbiol. 57:3006-3012.
- CIMMYT. 1986. Adiestramiento en maíz. Edit. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. México, México.
- Contreras, W. y Melo. 1974. Importancia social y económica de las reservas naturales. I.M.R.N.R. México.
- Cortés, M.M.M. 1986. Distribución de la endomicorriza Vesículo-Arbuscular en diez agroecosistemas de mango, *Mangifera indica* L., en el Estado de Veracruz. Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Fruticultura. CONAFRUT. D.F., México.
- Croes, C.I., S. Moens, E. Van Bastelaere, J. Vandeleiden y K.W. Mitchells. 1993. The polar flagellum mediate *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 139: 2261-2269.
- Dahm, H., H. Rozycki, E. Strzelczyk y C.Y. Li. 1993. Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures. Z. Mikrobiol. 148: 195-203.
- Day, J.M., y Döbereiner, J., 1976. Physiological aspects of  $\text{N}_2$ -fixation by *Spirillum* from digitaria roots. Soil. Biol. Biochem. 8: 45-50.
- Del Gallo, M. y A. Haegi. 1990. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. Symbiosis 9: 155-161.

- Del Gallo, M., M. Negi y C. A. Neyra. 1989. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum Lipoforum*. *J. Bacteriol.* 171: 3504-3510.
- Döbereiner, J., I.E. Marriel y M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoforum* Beijerinck. *Can J Microbiol.* 22: 1464-1473.
- Egawa, T. 1980. Propiedades de los suelos derivados de cenizas volcánicas. In: Suelos derivados de cenizas volcánicas en Japón. CIMMYT (Ed.) México
- Etchevers, B.J. 1985. Levantamiento nutricional de maíz en la Sierra Tarasca de Michoacán. *Agrociencia* 80
- Etchevers, B.J. 1991. El papel de los fertilizantes en la agricultura sostenible. In: Memorias del 1er Simposium Nacional "Agricultura Sostenible. Una opción para el desarrollo sin deterioro ambiental. Colegio de Posgraduados y M.O.A. Internacional (Eds.). México, México pp. 72-79
- Fabrizi, P. Y M. Del Gallo. 1995. Specific interaction between chickpea (*Cicer anatum*) and three chickpea-*Rhizobium* strains inoculated singly and in combination with *Azospirillum brasilense* Cd. In *Azospirillum VI and related microorganisms, genetics- physiology- ecology I*. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds.) NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, Vol. G37: 257-267.
- FAO. 1991a. Cuestiones y perspectivas en el marco de la agricultura y el desarrollo rural sostenible. In: Conferencia FAO/Paises Bajos sobre agricultura y medio ambiente. FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Ministerio de Agricultura, Ordenación de Recursos Naturales y Pesca de los Paises Bajos (Eds.). México.
- FAO. 1991b. Estrategias para la agricultura y el desarrollo rural sostenible en zonas con diferentes dotaciones de recursos naturales. In: Conferencia FAO/Paises Bajos sobre Agricultura y Medio Ambiente. FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Ministerio de Agricultura, Ordenación de Recursos Naturales y Pesca de los Paises Bajos (Eds.). México.
- FAO. 1991c. La Declaración de Den Bosch y el Plan de acción para una agricultura y un desarrollo rural sostenible. In: Conferencia FAO/Paises Bajos sobre Agricultura y Medio Ambiente. FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Ministerio de Agricultura, Ordenación de Recursos Naturales y Pesca de los Paises Bajos (Eds.). México.
- Fassbender, H. W. 1969. Efecto del encalado en la mejor utilización de fertilizantes fosfatados en un Andosol de Costa Rica. *Filotecnia Latinoamericana* 6: 115-126.
- Fedi, S., P. Montaini y F. Favilli. 1992. Chemotactic response of *Azospirillum* toward root exudates of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Symbiosis* 13: 101-105.
- Ferrera-Cerrato, R., M.C.A. González Ch. y M.N. Rodríguez M. 1993. Manual de agromicrobiología. Edit. Trillas. Mexico
- Figueroa, C.J.D., F. Martínez B., J. González H., F. Sánchez S., J.L. Martínez M. y M. Ruiz T. 1994. Modernización tecnológica del proceso de nixtamalización. *Avance y Perspectiva* 13:323-329.
- Fitter, A.H. 1985. Functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas under fields conditions. *New Phytologist.* 99:257-265.
- Footo, B.D. y J.B. Hanson. 1964. Ion uptake by soybean root tissue depleted of calcium by EDTA. *Plant Physiol.* 39:450-460.

- Foth, H.D. 1992. Fundamentos de la ciencia del suelo. 3ra. ed. Edit. CECSA. México.
- Foy, C. D. 1974. Effects of soil calcium availability on plant growth. *In: The plant root and its environment*. E.W. Carson (Ed.). University Press of Virginia. USA.
- Freitas, L.M.M., A.C. McClung y W.L. Lott. 1960. Field studies on fertility problems on two brazilian soils of campos cerrados IBEC. Research Inst. Bull. 21.1958-1959.
- Fulchieri, M., C. Lucangeli y R. Bottini. 1993. Inoculation with *Azospirillum lipoforum* affects growth and gibberellin status on corn seedling roots. *Plant Cell Physiol.* 34:1305-1309.
- Fyson, F. y A. Oaks. 1992. Rapid methods for quantifying VAM fungal infections in maize roots. *Plant and Soil* 147(2):317-319
- Gandoy, B.W. 1991. Manual de Laboratorio para el manejo físico de suelos. Colección Cuadernos Universitarios. Serie Agronomía No 22. Edit. UACH. México, México.
- García, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen: para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana 2da. ed. Edit. UNA. D.F., México.
- García, G.A. y G Hernández C. 1994. Levantamiento nutricional del cultivo de maíz en Andosoles del Municipio de Villa de Allende, Estado de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM D.F., México
- García, G.M.M., J.M. Sánchez-Yañez, J.J. Peña-Cabrales y P.E. Moreno-Zacarias. 1995. Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno *Terra* 13(1) 71-80.
- García-Pérez, R.E. 1996. La lombricultura y el vermicompost en México. *In: Memorias del Coloquio sobre Agricultura Orgánica: Una opción sustentable para el agro mexicano*. J.F. Ruiz F. (Ed.) UACH México, México.
- Gaucher, G. 1971. El suelo. Edit. Omega. Barcelona, España
- Galvito, M.E. y L. Varela. 1990. Abundancia y efectividad de hongos micorrizicos vesículo-arbusculares de suelos cultivados con maíz en el Estado de Morelos. *Rev. Mex. Micología* 6:259-269
- Galvito, M.E. y L. Varela. 1993. Seasonal dynamics of micorrhizal associations in maize fields under low input agriculture. *Agricul. Ecosys Environment* 45 3-4:275-282.
- Germida, J.J. 1986. Population dynamics of *Azospirillum brasilense* and its bacteriophage in soil. *Plant and Soil* 90:117-128.
- Gómez, C.G. y L. Corlay Ch. 1993. Microbiología de suelos. Edit. Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. México, México
- Gómez-Pompa, A. y S.A. Rodríguez. 1977. Problemas de investigación en Botánica. Edit. Limusa. México.
- González, A. U. 1995. El maíz y su conservación. Edit. Trillas. México.
- González, Ch.C. y Ferrera-Cerrato, R. 1989. Estudio comparativo de la endomicorriza V-A en el cultivo de maíz en la zona centro y sur de la República Mexicana. *In: La Investigación Edafológica en México 1988-1989. Memorias del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo*. M.A. Vergara S., G. Alcantar G. y A. Aguilar S. (Eds.), México. p 156
- Gori, A. y F. Favilli. 1995. First results on individual and dual inoculation with *Azospirillum - Glomus* on wheat. *In: Azospirillum VI and related microorganisms, genetics - physiology - ecology*. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De

- Zamaroczy (Eds.) NATO ASI Series, Series G. Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, G37:245-249.
- Grande, L.R. 1974. Métodos para análisis físicos y químicos en suelos agrícolas. Edit. Departamento de Suelo del Instituto de Investigación en Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. SLP, México.
- Grant, W.D. y P.E. Long. 1989. Microbiología ambiental Edit. Acribia Zaragoza, España.
- Guerrero, G.A. 1981. Cultivos herbáceos extensivos. 2da. ed. Mundi-Prensa México. 95-122 pp.
- Guzmán-Plazola, R.A. y R. Ferrera-Cerrato. 1990. La endomicorriza vesículo-arbuscular en las leguminosas. Edit. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados México, México.
- Herrera, R.A., A. Rodríguez y E. Furrázola. 1986. Método para determinar la biomasa del micelio extramático vesículo-arbuscular. In: Informe provisional No. 18. Ciclo lectivo sobre el tema técnicas de investigación en micorrizas. International Foundation of Science Stockholm, p. 197-207.
- Holguin, G., y Y. Bashan. 1996. Co-culturing of *Azospirillum brasilense* Cd with the mangrove rhizosphere bacteria *Stathylococcus* sp. promotes its nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. (accepted)
- INEGI. 1990. Carta topográfica Villa de Allende E14A36. Escala 1:50 000 D.F., México.
- Jackson, M.L. 1982. Análisis químico de suelos. 3ra. ed. Edit. Omega. Barcelona, España.
- Jeavons, J. 1991. Composta. In: Biotensivo de alimentos. T. Derrick (Ed.) México 38-52 pp.
- Johansen, A., I. Jakobsen y E.S. Jensen. 1994. Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. Plant and Soil 160:1-9.
- Levanony, H. y Y. Bashan. 1991. Active attachment of *Azospirillum brasilense* to root surface of non-cereal plants and to sand particles. Plant and Soil 137:91-97.
- Le Tacon, F. 1985. Las micorrizas, una cooperación entre plantas y hongos. Mundo Científico 5(49):776-784.
- López de Victoria, G., D.R. Fielder, R.K. Zimmer Faust y C.R. Lovell. 1994. Motility behavior of *Azospirillum* species in response to aromatic compounds. Can. J. Microbiol. 40:705-711.
- López, H. B. 1974. Phosphate desorption isotherms in four selected tropical soils and one temperature soil. Soil Sci. and Plant. Anal. 5:145-154.
- López, M.R. y A.J. Aguilar. 1990. Degradación química y productividad de suelos Andosoles dedicados al maíz en la Sierra Veracruzana. In: La Investigación Edafológica en México 1989-1990. Memorias del XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. A. Aguilar S., G. Alcantar G. y J. Etchevers B. (Eds). Comarca Lagunera, México, p. 168.
- Lozano, G.D.F. y R. López F. 1994. Recursos Naturales y Desarrollo Sostenible. Calidad Ambiental. 5(1) 15-17.
- Maehara, N., J. Kikuchi y K. Futa. 1993. Mycorrhizae of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*): protection of seedlings from acid mist effect of acid mist on micorrhiza formation. Can. J. Bot. 71(12):1562-1567.

- Mendoza, V. R. y M. Garza-Curcho. 1990. Respuesta del maíz (*Zea mays* L.) variedad Lucio Blanco (AN-361) inoculado con tres especies de *Azospirillum*. In: La Investigación Edafológica en México 1989-1990. Memorias del XXIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Comarca Lagunera, México. p 155-156
- Menge, J.A. 1983. Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. *Can. J. Bot.* 61:1015-1024.
- Michiels, K.W., C.L. Croes y J. Vardierleyden. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen Microbiol* 137:2241-2246.
- Miller, E.U. 1981. *Fisiología Vegetal*. Edit UTEHA. México.
- Miranda, C.S. 1996. La Agroastronomía. In: Memorias del Coloquio sobre Agricultura Orgánica: Una opción sustentable para el agro mexicano. J.F Ruiz F (Ed). UACH. México, México pp. 73-79
- Miranda, J.C.C. y P.J. Harris. 1994. The effect of soil phosphorus on the external mycelium growth of arbuscular mycorrhizal fungi during the early stages of mycorrhiza formation. *Plant and Soil* 166:271-280.
- Molina, G.E. 1997. Estado de fertilidad del suelo destinado a la producción de maíz en la subprovincia de Mil Cumbres, Edo. De México. Reporte de Servicio Social. FES-Zaragoza. D.F., México.
- Moreno, D.R. 1978. Clasificación de pH del suelo, contenido de sales y nutrimentos asimilables. Edit INIA-SARH. D.F., México.
- Núñez, E.R. 1991. El manejo de los fertilizantes en la conservación del suelo y del agua. In: Memorias del 1er Simposium Nacional "Agricultura Sostenible: Una opción para el desarrollo sin deterioro ambiental. Colegio de Posgraduados y M.O.A. Internacional (Eds.). México, México. pp. 310-321
- Nurlaeny, N., H. Marschner y E. George. 1996. Effects of liming and mycorrhizal colonization on soil phosphate depletion and phosphate uptake by maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) grown in two tropical acid soils. *Plant and Soil* 181:275-285.
- Nye, P.H. y G.J.D. Kirk. 1987. The mechanism of rock phosphate solubilization in the rhizosphere. *Plant & Soil* 100:127-134.
- Omay, S.H., W.A. Schmidt, P. Martin y F. Bangerh. 1993. Inoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. *Can. J. Microbiol.* 39:187-192.
- Orozco, M.O., M.E. Rodríguez, R.A. Herrera y R. Ferrera-Cerrato. 1986. Micorrizas VA, micelio extramatricio y otras poblaciones microbianas asociadas a troncos en descomposición en un bosque tropical. In: Informe Provisional No. 18. Ciclo lectivo sobre el Tema Técnicas de Investigación en micorrizas. International Foundation for Science (Ed.). Stockholm. pp. 251-271.
- Ortega, R.S.E. 1989. Aspectos fisiológicos y bioquímicos de *Azospirillum sp.* y su importancia en la agricultura. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM. D.F., México.
- Ortega, P.R., y Cortina V.H. 1991. Diversidad, Crisis y Sostenibilidad en la Agricultura Mexicana. In: Memorias del 1er. Simposium Nacional "Agricultura Sostenible: Una opción para el desarrollo sin deterioro ambiental. Colegio de Posgraduados y M.O.A. Internacional (Eds.). México, México. pp. 72-79.

- Ortiz-Caton, A. y R. Ferrera-Cerrato. 1996. Doble inoculación *Azospirillum*-Micorriza de cebolla en campo. *In: La Investigación Edafológica en México 1995-1996. Memorias del XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo*. V. Ordaz Ch., G. Alcántar G. y C. Castro B. (Eds). Ciudad Obregón, Sonora, México, p 112.
- Ortiz, S.C.A. 1985. Los principales suelos de México. Edit. Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo, México, México
- Ortiz, S.C.A., D. Pájaro H. y M.C. Gutiérrez C. 1990. Introducción a la leyenda del mapa mundial de suelos, FAO-Unesco Versión 1988. Edit. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados México, México
- Ortiz, V.B. y S.A. Ortiz. 1980. Edafología. Edit. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados México, México
- Pacovsky, R.S. 1989. Metabolic differences in *Zea-Glomus-Azospirillum* symbioses. *Soil Biochem.* 21(7):953-960
- Pacovsky, R.S., G. Fuller y E.A. Paul. 1985. Influence of soil on the interactions between endomycorrhizae and *Azospirillum* in sorghum. *Soil Biol Biochem.* 17:525-531.
- Parra, H. 1971. El encalamiento de cinco cultivos en suelos derivados de cenizas volcánicas, zona cafetera. *Suelos Ecuatoriales* 3:133-155.
- Rangel, L.J.A. y M.A. Vergara S. 1989. El uso de biofertilizantes como alternativa nutricional en maíz (*Zea mays* L.) caso de *Azospirillum* spp. *In: Memorias del XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo*. M.A. Vergara S., G. Alcántar G. y A. Aguilar S. (Eds) Edo de México, México. p 145
- Reyes, C. P. 1990. El maíz y su cultivo. Edit. A.G.T. Editor. D.F., México
- Reyes, C. P. 1992. Diseño de experimentos aplicados 3ra. ed. Edit. Trillas. D.F., México.
- Rhodes, L.H. y J.W. Gerdermann. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. *New Phytol.* 75:555-561.
- Richards, B.N. 1987. The microbiology of terrestrial ecosystems. Longman Scientific & Technical. New York, United States
- Robles, S.R. 1983. Producción de granos y forrajes. Edit. Limusa. México
- Robson, A.D., D.G. Edwards y J.G. Loneragan. 1970. Calcium stimulation of phosphate absorption by annual legumes. *Aust. J. Agr. Res.* 21:601-612.
- Rodelas, B., V. Salmeron, M.V. Martínez-Toledo y J. González-López. 1993. Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined media. *Plant and Soil* 153:97-101.
- Rodríguez, S.F. 1992. Fertilizantes y Nutrición Vegetal. Edit. AGT Editor. México
- Ruiz, B.A. y E. Ortega T. 1979. Química de suelos, prácticas de laboratorio. Edit. Patronato de la Universidad Autónoma Chapingo, México, México.
- Ruiz-Lozano, J.M., R. Azcon y M. Gómez. 1995. Effects of arbuscular mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: Physiological nutritional plant responses. *€1(2):456-460.*
- Saif, S.R. 1986. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in tropical forage species as influenced by season, soil texture, fertilizers, host species and ecotypes. *Angew Botanic* 60:125-139.
- Sánchez, P.A. y J.G. Salinas. 1981. Low-input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. *Advances in Agronomy* 34:279-406.

- Sarig, S., Y. Okon y A. Blum. 1992. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of *Sorghum bicolor* roots. J. Plant Nutr. 15:805-819.
- Schipper, L.A., C.G. Harfoot, P.N. McFartance y A.B. Cooper. 1994. Anaerobic decomposition and denitrification during plant decomposition in an organic soil. J. Environ. Qual. 23:923-928.
- Schubert A., C. Marzachi, M. Mazzitelli, M.C Cravero y P. Bonfante-Fasolo. 1987. Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol & Schenck. New Phytol. 107:183-190.
- S.C.S.A.E.U.A. (Servicio de Conservación de Suelos, Departamento de Agricultura de los Estado Unidos de América) 1987. Relación suelo-planta-agua. Edit Diana. México.
- Segura, P.A.A. 1982. Aplicación localizada de fósforo hasta saturación en un suelo de Ando de la Sierra Tarasca. Tesis de Licenciatura, Suelos, UACH. México, México.
- Shah, S., V. Karkhanis y A. Desai. 1992. Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum* Curr. Microbiol. 25:347-351.
- Sieverding, E. 1983. Métodos para investigación de la micorriza V-A en el laboratorio. CIAT/Proyecto micorriza. Cali, Colombia.
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza management in tropical agrosystems. Edit. Deutsche Gesellschaft, Germany.
- Sieverding, E. y L. Galvez A. 1988. Soil and phosphate sources affect performance of VA mycorrhizal fungi with cassava. Angew Botanik 62:283-293.
- Sieverding, E. y D.E. Leihner. 1984. Influence of crop and intercropping cassava with legumes on VA mycorrhizal symbiosis of cassava. Plant and Soil 80:143-146.
- Sieverding E. y S. Toro T. 1988. Influence of soil water regimes on VA mycorrhiza. V Performance of different VAM fungal species with cassava. J. Agronomy & Crop Science 161:322-332.
- Sieverding E. y S. Toro T. 1989. Biomass production and nutrient concentrations in spores of VA mycorrhizal fungi. Soil Biol. Biochem. 21:69-72.
- Sprent, J. I. y P. Sprent. 1990. Nitrogen fixing organisms 2da. ed. Edit. Chapman and Hall. Great Britain.
- Sriskandarajah, S., I.R. Kennedy, D. Yu y. T. Tachan. 1993. Effects of plant growth reguladoras on acetylene-reducing associations between *Azospirillum brasilense* and wheat. Plant and Soil. 153:165-178.
- St John, T.V. 1980. Root size, root hairs and mycorrhizal infections: a reexamination of Baylis's hypothesis with tropical trees. New Phytol. 84:403-487.
- Stribley, D.P., P.B. Tinker y J.H. Rayner. 1980. Relation of internal phosphorus concentration and plant weight in plants infected by vesicular-arbuscular mycorrhizas. New Phytol. 86:261-266.
- Strzelczyk, E., M. Kampert y C.Y. Li. 1994. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. Microbiol. Res. 149:55-60.
- Sutton, J.C., y B.R. Sheppard. 1976. Aggregation of sand-dune soil by endomycorrhizal fungi. Can. J. Bot. 54: 326-333.

- Tamhane, R.V., D.P. Motiramani, Y.P. Bali y R.L. Donahue. 1986. Suelos: su química y fertilidad en zonas tropicales. Edit. Diana. D.F., México.
- Tanaka, A. 1980. Problemas nutricionales y el uso de fertilizantes. In: Suelos derivados de cenizas volcánicas en Japón. CIMMYT (Ed.). México, México.
- Tarrand, J.J., N.R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spillium lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24:967-980.
- Thompson, L.M. y F.R. Troeh. 1982. Los suelos y su fertilidad. 4ta. Ed. Reverté. Barcelona, España.
- Thomson, B.D., A.D. Robson y L.K. Abbott. 1985. Sulfur supply and the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas by *Glomus fasciculatum* on subterranean clover. Soil. Biol. Biochem. 17:877-879.
- Tien, T.M., M.H. Gaskins y D.H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol. 37(5):1016-1024.
- Tisdale, L.S. y J.O. Beaton. 1988. Soil fertility and fertilizers. 4ta. ed. Edit. Mcmillan Publish. New York, USA.
- Tocagni, H. 1980. El maíz. Edit. Albatros. Buenos Aires, Argentina.
- Trueba, C.S. 1995. Entrevista personal concedida a las autoras en las instalaciones del grupo NOCON (Av. Juárez s/n San Simón, Texcoco, Estado de México) el día 2 de febrero de 1995.
- Trueba, C.S. 1996. Fertilizantes Orgánicos y Compostas. In: Memorias del Coloquio sobre Agricultura Orgánica: Una opción sustentable para el agro mexicano. J.F. Ruiz F. (Ed.) UACH. México, México.
- Varma, A.K., K. Singh y H.D. Peck Jr. 1985. Influence of mycorrhizal fungi and *Rhizobium* inoculation on chickpea and grow characteristics of lumen bacteria. Proceedings of the sixth North American Conference on Mycorrhizae. Oregon, U.S.A.
- Veeraswamy, J., T. Padmavathi y K. Venkateswarlu. 1992. Interaction effects of *Glomus intraradices* and *Azospirillum lipoferum* on sorghum. Indian J. Microbiol. 32:305-308.
- Vergara, S.M.A. 1986. Efecto de la adición de calcio y fósforo sobre el desarrollo y absorción de fósforo por plantas de maíz en un andosol. Tesis de Maestría Centro de Edafología. Colegio de Postgraduados. Edo. de México, México.
- Vergara, S.M.A. 1992. Problemas nutrimentales y el uso de fertilizantes en Andosoles. Edit. Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. México, México.
- Villarreal, R.M., R. Ferrera-Cerrato., V.H. Volke y A. Hernández. 1990. Doble inoculación de *Azospirillum* sp. y Endomicorriza (V-A) en trigo (*Triticum aestivum* L.). In: La Investigación Edafológica en México 1989-1990. Memorias del XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. A. Aguilar S., G. Alcántar G. y J. Etchevers B. (Eds) Comarca Lagunera, México. p 154.
- Weier, K.L. 1980 Nitrogen Fixation associated with grasses. Tropicals Grasslands. 14(3):194-201.
- Worthen, E.L. y S.R. Aldrich. 1980. Suelos agrícolas, su conservación y fertilización. 2da. ed. Edit. UTEHA. D.F., México.

- Zamudio, M. y F. Bastarrachea. 1994. Adhesiveness and root hair deformation capacity of *Azospirillum* strains for wheat seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 26:791-797.
- Zhulin, I.B. y J.P. Armitage. 1993. Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 175:952-958.

## ANEXO

### PREPARACIÓN DE UNA COMPOSTA

Para la elaboración de una composta se requiere, primeramente, delimitar un cuadrado con ladrillos, maderas, etc. hasta una altura aproximada de 1.5 m. Después se coloca una capa de 20 cm de paja, en seguida una de vegetación seca de 10 cm, luego una de desperdicios de comida, vegetación verde y estiércol, posteriormente, se agregan al voleo aproximadamente 20 g de activadores de composteo y se riega con bastante agua. Se repite dicha operación hasta obtener una altura de 1.5 m teniendo varias capas de dichos materiales. Finalmente, se cubre el montón con un hule de color oscuro (preferentemente negro) y se riega el montón diariamente durante la primera semana, después cada semana hasta que esté listo para usarse (de 5 a 6 semanas). Hay que recordar que de un montón inicial de 1.5 m de alto sólo quedará uno de 50 ó 75 cm de alto (Trueba, 1995).

### EVALUACIÓN DE LA COLONIZACIÓN ENDOMICORRÍZICA

**Muestreo de raíces.** La distribución de la colonización endomicorrízica V-A en campo es muy variable, pero es aceptable si se toman al azar como muestra representativa las raíces de cinco plantas en una superficie de 12 m<sup>2</sup>. La forma de obtener el sistema radical variará de acuerdo con la especie, estado de desarrollo de la planta, topografía del terreno y características del suelo.

Es recomendable extraer con mucha precaución el sistema radical, de lo contrario las raíces sufren daños mecánicos, y pierden gran cantidad de raicillas, lo que origina bajos porcentajes de colonización.

Las muestras radicales pueden procesarse inmediatamente o fijarse en FAA para su examen posterior.

**Tinción de raíces.** El procedimiento de Phillips y Hayman (1970) involucra: a) clareo, b) blanqueo, c) acidificación, d) tinción y e) decoloración.

Las raíces libres de suelo se colocan en cápsulas esterilizables, en un vaso de precipitados al que se agrega suficiente KOH al 10% para cubrirías. Se procede a calentar por 10 minutos bajo 10 libras de presión (clareo). El KOH es retirado y las cápsulas con las raíces se enjuagan con agua destilada. Se agregan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% en suficiente cantidad para que cubra las raíces durante 3 min., pasado este tiempo se

procede a enjuagar con agua destilada (blanqueo). Las raíces se cubren con HCl al 10% por tres min., se elimina el ácido y sin enjuagar se procede a la tinción (acidificación). Las cápsulas que contienen las raíces se cubren con la solución colorante (azul tripano 0.05% en lactoglicerol) y se calienta por 10 min. a 10 libras de presión (tinción). El colorante se elimina y se decoloran las raíces con lactoglicerol limpio (decoloración).

**Cuantificación de los porcentajes.** Requiere el montaje de raíces teñidas en portaobjetos para lo cual se colocan raíces clareadas y teñidas en cajas de Petri con suficiente lactoglicerol. En un portaobjetos y con agujas de disección, se colocan 20 segmentos de aproximadamente 1 cm, paralelamente unos a otros. Sobre las raíces se adicionan gotas de lactoglicerol colocando los cubreobjetos, se eliminan las burbujas y cada laminilla se sella con esmalte. Para realizar la evaluación se observa al microscopio con el aumento de 100x; se efectúan tres pasajes equidistantes por laminilla.

Al revisar un campo óptico donde se encuentra un segmento que contiene hifas, vesículas y/o arbusculos, independientemente de la intensidad de micorrización se da el valor de uno para la evaluación total y por estructura.

El porcentaje de colonización endomicorrizica por estructuras y total, se obtiene mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Porcentaje de colonización total} = \frac{\text{número de segmentos colonizados} \times 100}{\text{número de segmentos totales}}$$

$$\text{Porcentaje de colonización vesicular} = \frac{\text{número de segmentos con vesículas} \times 100}{\text{número de segmentos totales}}$$

$$\text{Porcentaje de colonización arbuscular} = \frac{\text{número de segmentos con arbusculos} \times 100}{\text{número de segmentos totales}}$$

**Extracción y cuantificación de esporas.** Se hace una suspensión con 100 g de suelo y aproximadamente 2000 ml de agua de la llave. Se agita cada 15 minutos durante 1 hr y se deja reposar por 20 segundos, con la finalidad de eliminar partículas grandes por sedimentación. La suspensión se pasa a través de una serie de tamices (aproximadamente 10) de 500 a 44 micras (apilados de abajo hacia arriba, del de malla más fina al de más gruesa). Se agrega agua al decantado y se repiten los pasos anteriores dos veces más. Se recoge con agua la fracción obtenida en el tamiz de 44 micras, se pasa a un vaso de precipitados de 250 ml y se llena hasta 180 ml de agua, se agita y se permite la sedimentación por 10 seg., nuevamente se pasa por el tamiz de 44 micras, el decantado se recoge en una probeta de 50 ml para su cuantificación. La cantidad de esporas se obtiene al contar el número de éstas contenidas en 1 ml de la última solución.

Para la cuantificación de esporas se necesitan portaobjetos (con una área aproximada de 1.5x1.5 cm, delimitada por tubos capilares pegados al mismo) capaces de retener 1 ml de solución acuosa mientras se revisa al microscopio dicha placa. Antes de tomar la muestra (1 ml) es necesario burbujear la solución y dejar que se sedimente por 10 seg. Se sugiere tomar la muestra con pipeta y no del fondo de la probeta. Tapar con un cubreobjetos, deslizando desde una de las paredes para evitar que queden burbujas dentro. El cálculo del número de esporas en 100 g de suelo se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de esporas} = (50)(\text{número de esporas contadas})$$

### **OBSERVACIÓN DE *Azospirillum***

**Aislamiento a partir de raíces.** Para el aislamiento a partir de raíces se procede a seguir nueve pasos: 1) eliminar el suelo adherido a las raíces y lavarlas con agua de la llave, 2) cortarlas en pedazos de 5 a 8 mm de longitud, procurando que la región axilar quede intermedia, 3) desinfectar la superficie de los pedazos de raíz con cloramina T durante 3 a 5 min., 4) lavar con agua destilada estéril por lo menos 5 veces para eliminar todo el residuo de cloramina T, 5) con las pinzas colocar los pedazos de raíz en los tubos con medio Nfb semisólido, en condiciones asépticas, procurando que queden dentro del medio, 6) incubar a 32 - 35 °C, durante 18 - 24 hrs., al cabo de este tiempo la presencia de *Azospirillum* será indicada por la formación de una película fina blanquecina cercana a la superficie del medio y vire del indicador de verde a azul por modificación del pH, 7) hacer una preparación húmeda y una tinción de Gram del crecimiento observado en los tubos y observarlas al microscopio, 8) usando el método de aislamiento por estría, sembrar en 3 placas de agar nutritivo o malato-rojo congo e incubar durante 24 - 48 hrs. a 32 - 35 °C y 9) seleccionar las colonias típicas de *Azospirillum* y observarlas mediante preparación húmeda y tinción de Gram.

**Tinción de Gram.** Tomar por los bordes un portaobjetos perfectamente limpio, flamearlo ligeramente en la flama de un mechero y dejar que se enfríe. Con el asa de siembra, esterilizada y enfriada, tomar una gota pequeña del medio de cultivo homogeneizado, colocarla sobre el portaobjetos limpio y extenderla hasta formar una capa fina. Dejar secar el frotis al aire. Cuando esté seco el frotis, fijarlo. Para esto pasar el portaobjetos rápidamente por la flama del mechero unas tres veces procurando que la superficie donde está el frotis quede hacia arriba. Cubrir el frotis ya fijado con solución de cristal violeta durante 1 minuto. Escurrir el colorante. Lavar, cubrir el frotis con lugol durante 1 minuto. Escurrir y lavar con agua de la llave. Inclinar el portaobjeto y decolorar con alcohol-acetona gota a gota hasta que aparezca la primera gota incolora (10 - 15 seg.). Lavar con agua de la llave. Cubrir con solución de safranina durante 1 min. Lavar con agua, escurrir y dejar secas al aire. Observar al microscopio.

**SOLUCIONES**Ácido clorhídrico al 10%

HCl	10 ml
Agua destilada	100 ml

Después de disolver, aforar a 1000 ml.

Azul tripano en lactoglicerol (0.05%)

Azul tripano	500 mg
Lactoglicerol	1000 ml

Agar nutritivo

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
pH	6.8 - 7.0
Agua destilada	1000 ml

Cloramina T

Cloramina T	1 g
Agua destilada estéril y fría	100 ml

Cristal violeta

A. Cristal violeta	2 g
Etanol (95%)	20 ml
Agua destilada	30 ml
B. Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	50 ml

Se recomienda, en la solución A, disolver el cristal violeta en el etanol y después agregar el agua destilada. Posteriormente mezclar ambas soluciones y filtrar.

FAA

Formol	10 ml
Ácido acético glacial	5 ml
Alcohol de 95-96%	50 ml
Agua destilada	35 ml

Hidróxido de potasio al 10%

KOH	10 g
Agua destilada	100 ml

Lactoglicerol

Ácido láctico	500 ml
Glicerol	500 ml
Agua destilada	500 ml

Lugol

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Etanol	25 ml
Agua destilada	100 ml

Medio malato rojo congo

Ácido málico	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	0.05 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.015 g
KOH	4.8 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH 7.0 con NaOH 0.01 N. Esterilizar en autoclave a 15 psi/15 min. añadir asépticamente 15 ml de solución acuosa de rojo congo (1:400), esterilizado por separado.

Medio Nfb semisólido

Ácido málico	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.002 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.01 g
Fe-EDTA (Sol. 1.64%)	4 ml
Azul de bromotimol en etanol (0.5%)	3 ml
KOH	4.5 g
Biotina (0.01%)	1 ml
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH 6.8 con solución de KOH al 10%, agregar 1.8 g de agar previamente disuelto por separado y esterilizar en autoclave (15 psi/15 min.).

Peróxido de hidrógeno al 10%

Peróxido de hidrógeno	10 ml
Agua destilada	100 ml

Safranina

Safranina	2.5 g
Etanol (95%)	10 ml
Agua destilada	100 ml

Se recomienda disolver la safranina en el etanol y después agregar el agua destilada y finalmente filtrar.

## APÉNDICE

A los resultados experimentales se les aplicó una prueba de significancia estadística (Prueba de Tukey) con un límite de error del 5%.

A continuación se muestran las tablas que indican la presencia o ausencia de diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

### Las Peñas, Villa Victoria

Tabla A. Porcentaje de fósforo foliar en maíz de Las Peñas

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	1										
80-60	0	0									
M-80	1	1	1								
M-80-40	0	1	0	1							
M-80-60	1	1	1	1	1						
A	1	1	1	0	1	1					
A-0-40	1	0	1	1	1	0	1				
A-0-60	0	0	0	1	0	1	1	1			
M-A	0	0	0	1	0	1	1	1	0		
M-A-0-40	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	
M-A-0-60	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0

"1" indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

Tabla B. Porcentaje de nitrógeno foliar en maíz de Las Peñas.

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	0										
80-60	1	1									
M-80	1	1	1								
M-80-40	0	1	1	1							
M-80-60	0	1	1	1	0						
A	1	1	1	1	1	1					
A-0-40	1	1	1	1	0	0	1				
A-0-60	1	1	1	1	1	1	0	1			
M-A	1	1	0	1	1	1	1	1	1		
M-A-0-40	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
M-A-0-60	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0

"1" indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

Tabla C. Altura de la parte aérea de las plantas en Las Peñas

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	0										
80-60	1	0									
M-80	0	1	1								
M-80-40	0	0	0	0							
M-80-60	1	0	0	1	0						
A	1	0	0	1	0	0					
A-0-40	1	1	1	1	1	0	1				
A-0-60	1	0	0	1	0	0	0	1			
M-A	1	0	1	1	0	1	0	1	0		
M-A-0-40	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	
M-A-0-60	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0

"1" indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

Tabla D. Peso de la raíz de las plantas en Las Peñas.

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	0										
80-60	0	0									
M-80	0	0	0								
M-80-40	0	0	1	0							
M-80-60	0	1	0	1	1						
A	0	0	0	0	0	1					
A-0-40	0	0	0	0	0	1	0				
A-0-60	0	0	1	0	0	1	0	1			
M-A	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
M-A-0-40	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	
M-A-0-60	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

\*1" indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

Tabla E. Rendimiento de grano seco de maíz en Las Peñas.

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	0										
80-60	1	0									
M-80	0	0	1								
M-80-40	0	0	1	0							
M-80-60	0	0	1	0	0						
A	0	0	1	1	0	0					
A-0-40	0	0	0	1	1	0	1				
A-0-60	0	0	0	0	0	0	0	0			
M-A	0	0	0	0	1	0	1	0	0		
M-A-0-40	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	
M-A-0-60	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0

\*1" indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

Tabla F. Análisis estadístico realizado para los datos de rendimiento de grano seco de maíz en Las Peñas.

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	1 3548 0 3082										
80-60	4 8949 0 0392	3 3430 0 0790									
M-80	0 3479 0 7611	-1 593 0 2520	17 41 3 28								
M-80-40	-2 437 0 1352	-3 829 0 0619	7 04 0 0164	-3 621 0 0685							
M-80-60	0 2299 0 8395	-1 243 0 3398	5 478 0 0317	-0 062 0 9557	2 8530 0 1040						
A	-1 429 0 2892	-3 547 0 0711	29 42 1 15	11 00 0 00	1 9977 0 1838	-2 0769 0 1734					
A-0-40	3 3236 0 0798	1 9249 0 1941	-1 220 0 3467	5 0833 0 0386	5 0779 0 0272	3 4513 0 0747	7 6779 0 0165				
A-0-60	-0 782 0 5161	-1 785 0 2161	-3 968 0 0580	-1 130 0 3757	1 0701 0 3966	-0 9814 0 4299	-0 0378 0 9733	-3 1451 0 0879			
M-A	2 4065 0 1377	1 0380 0 4083	-2 188 0 1600	3 2878 0 0814	4 2425 0 0386	2 4092 0 1376	5 4065 0 0318	-0 8763 0 4733	2 5345 0 1267		
M-A-0-40	-0 849 0 4853	-2 867 0 1039	10 18 2 71	4 440 0 0451	2 4711 0 1321	-1 3584 0 3073	2 5485 0 1256	4 4068 0 0221	0 3799 0 7406	7 4850 7 009	
M-A-0-60	-3 427 0 0756	-1 859 0 0430	1 789 0 0162	2 488 0 0488	-1 2955 0 3243	-3 8107 0 0625	-3 1956 0 0855	4 8000 0 0220	-2 0408 0 1781	4 5771 7 009	-3 5592 0 0707

En cada celda hay dos valores: el de arriba corresponde a la "t estimada" y el de abajo a la "t calculada". Los datos sombreados indican la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la fila y de la columna, respectivamente.

*Las Mesas de Zacango, Villa de Allende*

Tabla G. Porcentaje de fósforo foliar en maíz de Las Mesas de Zacango.

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	0										
80-60	1	1									
M-80	0	0	1								
M-80-40	0	1	0	0							
M-80-60	0	0	1	0	0						
A	0	0	1	0	1	0					
A-0-40	0	0	1	0	1	0	0				
A-0-60	0	1	0	0	0	0	1	1			
M-A	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
M-A-0-40	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
M-A-0-60	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0

\*1\* indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

Tabla H. Porcentaje de nitrógeno foliar en maíz de Las Mesas de Zacango.

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	1										
80-60	1	1									
M-80	1	1	1								
M-80-40	1	0	1	1							
M-80-60	1	1	0	0	1						
A	0	1	1	0	1	1					
A-0-40	1	1	0	1	1	0	1				
A-0-60	0	0	1	1	0	1	1	1			
M-A	1	1	0	1	1	1	1	0	1		
M-A-0-40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
M-A-0-60	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

"1" indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

Tabla I. Altura de la parte aérea de las plantas en Las Mesas de Zacango.

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	0										
80-60	0	0									
M-80	0	0	0								
M-80-40	1	0	0	0							
M-80-60	0	0	0	0	1						
A	1	0	1	0	0	1					
A-0-40	1	0	0	0	0	1	0				
A-0-60	1	1	1	0	1	1	0	0			
M-A	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
M-A-0-40	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	
M-A-0-60	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0

"1" indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

**Tabla J. Peso de la raíz de las plantas en Las Mesas de Zacango.**

	80	80-40	80-80	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	1										
80-60	0	1									
M-80	0	1	0								
M-80-40	0	1	0	0							
M-80-60	1	1	0	0	0						
A	1	1	0	1	0	0					
A-0-40	0	1	0	0	0	0	0				
A-0-60	0	1	0	0	0	0	1	0			
M-A	0	1	0	0	0	0	1	0	0		
M-A-0-40	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
M-A-0-60	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*1" indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

**Tabla K. Rendimiento de grano seco de maíz en Las Mesas de Zacango.**

	80	80-40	80-80	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	1										
80-60	1	0									
M-80	0	0	0								
M-80-40	1	1	1	0							
M-80-60	1	0	0	0	0						
A	0	1	1	0	1	1					
A-0-40	0	1	1	0	1	1	0				
A-0-60	0	1	1	0	1	1	0	0			
M-A	0	1	1	0	1	1	0	0	0		
M-A-0-40	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	
M-A-0-60	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0

\*1" indica la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la primera fila y de la primera columna. "0" indica sin diferencia estadística significativa.

Tabla L. Análisis estadístico realizado para los datos de rendimiento de grano seco de maíz en Las Mesas.

	80	80-40	80-60	M-80	M-80-40	M-80-60	A	A-0-40	A-0-60	M-A	M-A-0-40
80-40	1.3343										
80-60	0.3949	0.7311									
M-80	-1.7491	3.7042	3.8169								
M-80-40	0.2224	0.0658	0.0623	-1.8734							
M-80-60	0.2224	0.0658	0.0623	0.2019							
A	0.4122	0.9249	0.7320	-3.4466	-3.1720						
A-0-40	-1.3343	12.3343	12.3343	1.5505	12.3343	12.3343					
A-0-60	0.3137	0.3137	0.3137	0.2699	0.4049	0.4049					
M-A	-1.0497	12.3343	12.3343	1.6005	12.3343	12.3343	0.4049				
M-A-0-40	0.4040	0.4040	0.4040	0.2506	0.7248	0.7248	0.7248				
M-A-0-60	-0.4637	0.4637	0.4637	1.6936	14.0518	14.0518	0.9057	0.5519			
	0.6885	0.6885	0.6885	0.2324	0.6354	0.6354	0.4607	0.6354			
	0.5528	0.5528	0.5528	1.8359	0.3810	0.3810	1.1144	0.9177	0.6753		
	0.6359	0.6359	0.6359	0.2077	0.3810	0.3810	0.3810	0.4556	0.5691		
	-2.2615	1.1002	1.1002	0.3860	-1.2480	-1.2480	-1.2480	-1.5995	-1.9679	-1.8985	
	0.1521	0.3860	0.3860	0.3383	0.2510	0.2510	0.3383	0.2510	0.1879	0.1984	
	1.9765	2.0338	2.0338	-2.3712	-2.2415	-2.2415	-1.9558	-0.3779	-2.9752		
	0.1867	0.1789	0.1789	0.1411	0.1542	0.1542	0.1696	0.7418	0.0968		

En cada celda hay dos valores, el de arriba corresponde a la "t estimada" y el de abajo, a la "t calculada". Los datos sombreados indican la presencia de diferencia estadística significativa entre el tratamiento de la fila y de la columna, respectivas.