



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y
SUSTENTABILIDAD
ECOLOGÍA**

**Influencia de las prácticas de fertilización mineral e irrigación
sobre las interacciones micorriza-suelo y su relación con el
crecimiento y productividad del maíz (*Zea mays* L)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DANTE ALEJANDRO LÓPEZ CARMONA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. John Larsen

**Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y
Sustentabilidad, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

Dr. Alejandro Alarcón

Colegio de Postgraduados, Montecillo.

Dra. María Esperanza Martínez Romero

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

MORELIA MICH. ABRIL del 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y
SUSTENTABILIDAD
ECOLOGÍA**

**Influencia de las prácticas de fertilización mineral e irrigación
sobre las interacciones micorriza-suelo y su relación con el
crecimiento y productividad del maíz (*Zea mays* L)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DANTE ALEJANDRO LÓPEZ CARMONA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. John Larsen

**Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y
Sustentabilidad, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

Dr. Alejandro Alarcón

Colegio de Postgraduados, Montecillo.

Dra. María Esperanza Martínez Romero

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

MORELIA MICH. MARZO del 2019

OFICIO CPCB/347/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 11 de marzo de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** al alumno **LÓPEZ CARMONA DANTE ALEJANDRO**, con número de cuenta **512012218**, con la tesis titulada, "**Influencia de las prácticas de fertilización mineral e irrigación sobre las interacciones micorriza-suelo y su relación con el crecimiento y productividad del maíz (*Zea Mays L.*)**", realizada bajo la dirección del **DR. JOHN LARSEN**:

Presidente: Dr. Francisco Bautista Zuñiga
Vocal: Dra. Marta Astier Calderón
Secretaria: Dra. Maria Esperanza Martínez Romero
Suplente: Dr. Erick de la Barrera Montppellier
Suplente: Dr. Noé Manuel Montano Arias

Sin otro particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de marzo de 2019

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos institucionales

Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación de doctorado. Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por facilitar todos los mecanismos administrativos y económicos a través del PAEP que tuve durante mi formación.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme la beca de posgrado, la beca mixta para la realización de mi estancia de investigación y por el financiamiento a la tesis a través del proyecto de Ciencia Básica: "Importancia de los microbios benéficos de la rizósfera en la producción sustentable de maíz".

Al Dr. John Larsen tutor de esta tesis

Al Dr. Alejandro Alarcón y a la Dra. Esperanza Martínez Romero miembros del comité tutor.

Agradecimientos personales

Durante el tiempo que he sido estudiante de doctorado, he conocido a tantas personas que han contribuido en mi formación académica y personal, que es casi imposible enumerarlas en los siguientes renglones. Sin embargo, quiero agradecer a todos los que sin saber o con toda la alevosía, llenaron un espacio de enseñanzas que llevaré en mi corazón hasta que mi mente lo permita, GRACIAS.

Agradezco al Dr. John Larsen, quien fue mi tutor. Gracias por darme muchas lecciones de vida y ser un guía en mi formación.

Al Dr. Alejandro Alarcón, quien siempre estuvo dispuesto a contribuir y corregir las fallas que tuve.

A la Dra. Esperanza Martínez Romero por su apoyo en mi formación.

La jurado: Dr. Erick de la Berrera, Dra. Marta Astier, Dr. Noe Montaña por sus valiosas contribuciones en la revisión de la tesis, la cual, no sería lo que es sin sus atinadas observaciones.

Al Dr. Francisco Bautista, quien además de ser parte de mi jurado, es un excelente ser humano, que me ha dado la oportunidad de ampliar mis conocimientos a través de enseñanzas científicas, prácticas y de la vida cotidiana. Gracias por brindarme la oportunidad de colaborar en su equipo y crecer como científico y ser humano.

Al Laboratorio de Agroecología y a todos mis compañeros. En especial a Semiramis y Andrea, casi una década de conocernos y compartir infinidad de experiencias que, sin duda, han aminorado la carga del ser "estudiante". A Omar, Hexon, Dania, Zabdi, Ricardo "El Tigre", David, Gris, Carlitos, Pablo, Rosa y a todos aquellos que coincidimos en cosechas, aseo, reuniones, a toda la familia académica Larsen.

A mi estimado colega el Dr. Alfredo Carrera, por su apoyo en el trabajo de campo y brindarme la oportunidad de colaborar con él más allá las actividades del doctorado.

Al Dr. Juan Manuel Ruiz-Lozano, por aceptarme en su laboratorio para la realización de mi estancia de investigación en la Estación Experimental del Zaidín CSIC. Y obviamente a los compañeros con quien compartí.

A la Técnico Maribel Nava, técnico del IIES, quien me ayudó mucho en la determinación de nutrientes de tejidos vegetales.

A mi familia que siempre estuvieron presentes de una manera u otra. En especial a mi madre, Gabriela y mis hermanos Diego y Mayo por apoyarme en el trabajo de algunas largas jornadas de cosecha y mantenimiento de experimentos y porque simplemente son un aliento para seguir adelante. A mi padre Alejandro y mis hermanos Arafat, Alexa y Vanzetti porque a pesar de ser poco el tiempo que podemos compartir, siempre están en mi corazón. A mi tía Ceci y mi abuela Belem porque desde el niño siempre me han apoyado e impulsado a ser mejor. Gracias a todos porque saber que cuento con ustedes me hace más fuerte.

A Paola G. Gallardo "Bioma" a quien conocí desde que se integró al Laboratorio de Agroecología; te convertiste en una parte fundamental del cierre de mi formación doctoral. Gracias por todo tu amor, porque sin duda, hiciste que las cosas fueran más sencillas, gracias por las discusiones agroecológicas, por los ánimos y los regaños, pero sobretodo por animarte a tomarte de mi mano y caminar juntos a donde el viento nos lleve. Estoy seguro que sin ti, la vida sería aburrida.

Dedicatoria

La vida es un mar de experiencias que se llevan en el corazón, hasta que la mente lo permite.

A la vida

A mi familia

A todos los incondicionales de mi vida

Especialmente a mi tía Ana† y abuela Belem

Índice

Índice	I
Lista de figuras	II
Lista de cuadros	VI
Resumen	1
Abstract.....	3
Capítulo 1. Introducción general	5
Introducción general	6
Hipótesis	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos.....	15
Estructura de la tesis.....	16
Referencias bibliográficas	18
Chapter 2. Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios.....	26
Chapter 3. Mycorrhizal response in maize depends on soil group, mineral P fertilization, maize genotype and field populations of arbuscular mycorrhizal fungi	27
Chapter 4. Field populations of arbuscular mycorrhizal fungi regulate water stress response in maize	56
Capítulo 5. Importancia de los HMA nativos de un Vertisol en la producción y calidad del grano de tres genotipos de maíz	82
Capítulo 6. Discusión y conclusiones generales.....	104

Lista de figuras

Capítulo 1. Introducción general

Figura 1 Modelo de estudio de esta tesis doctoral. Se muestran los tres componentes de la rizósfera de maíz (planta-suelo-microorganismo), los elementos bióticos, abióticos y las prácticas de manejo que pueden influir sobre la simbiosis micorrícica arbuscular y que son analizados durante los capítulos experimentales de presente investigación..... 14

Capítulo 2. Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios.

Figure 1. Shoot (a) and root (b) dry weight and plant growth response to rhizosphere microorganisms (c) of eight-week-old maize plants without microbial inoculation or inoculation with whole rhizosphere microbial communities obtained from Michoacán, Guanajuato and Estado de México in combination with different mineral fertilization scenarios all with basic fertilization differing only in application of N and P: Without, with P, with N and with N and P). Values represent treatment means with standard error bars (n = 4). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).....26

Figure 2. Shoot N (a) and P (b) concentration and total shoot N (c) and P (d) content of eight-week-old maize plants without microbial inoculation or inoculation with whole rhizosphere microbial communities obtained from Michoacán, Guanajuato and Estado de México in combination with different mineral fertilization scenarios all with basic fertilization differing only in application of N and P: Without, with P, with N and with N and P). Values represent treatment means with standard error bars (n = 4). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).....27

Figure 3. Shoot N response to rhizosphere microorganisms of the factor treatment means of the Inoculum x N interaction (a) and shoot P response to rhizosphere microorganisms of the factor treatment means of the interactions Inoculum x P (b) and N x P (c) of eight-week-old maize plants. Values represent treatment means with standard error bars (a, n= 8; b, n =8; c, n= 16). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).....28

Figure 4. AMF root colonization of the factor treatment means of Inoculum \times N (a) and Inoculum \times P (b) interactions of eight-week-old maize plants inoculated with whole rhizosphere microbial communities obtained from Michoacán, Guanajuato and Estado de México. Values represent treatment means with standard error bars (a, n = 8; b, n = 8). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).....28

Fig. 5. Factor treatment means of the “Inoculum \times P” interaction of the abundance of the AMF (nmole g⁻¹ soil) (a) and single factor effects of “Inoculum” (b) and N (c) of the abundance of Actinobacteria (nmole g⁻¹ soil) of eight-week-old maize plants. Values represent treatment means with standard error bars (a, n = 8; b, n = 16; c, n = 32). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$)30

Fig. 6. Factor treatment means of single factor effects of N on the root specific abundance (nmole g⁻¹ root) of Gram⁺ bacteria (a), Gram⁻ bacteria (c) and AMF (e), single factor effect of P on the root specific abundance of Gram⁻ bacteria (b) and single factor effect of Inoculum on the root specific abundance of AMF (d) of eightweek-old maize plants. Values represent treatment means with standard error bars (a, n = 32; b, n = 32; c, n = 32; d, n = 16; e, n = 32). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).....31

Capítulo 3. Mycorrhiza growth response in maize depends on soil type, mineral P fertilization, maize genotype and field populations of arbuscular mycorrhizal fungi

Figure 1 Root (a) and shoot (b) growth of maize in three soils (Vertisol, Luvisol and Andosol) with and without native AMF inoculum. All treatments had basic fertilization differing only in phosphorus with (+P) and without (-P). Values represent treatment means with standard error bars (n = 4). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA test (LSD, $p \leq 0.05$). 52

Figure 2 Mycorrhizal growth response (MGR) of maize growth of two ANOVA interactions, (a) soil (Vertisol, Luvisol and Andosol) and (b) AMF inoculum per fertilization with (+P) and without (-P) phosphorus. The plants of both analysis grew for ten weeks. Values represent treatment means with standard error bars (n = 4). Treatments with different letters are significantly different according to LSD test ($p \leq 0.05$). 53

Figure 3 Root (a) and shoot (b) growth of three maize genotypes (Puma, Mushito and Chalqueño) in three soil (Vertisol, Luvisol and Andosol) disinfected or not. Values

represent treatment means with standard error bars (n = 4). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA LSD test ($p \leq 0.05$)..... 54

Figure 4 AMF root colonization of a) triple ANOVA interaction: soil (Vertisol Luvisol and Andosol) × AMF community (Vertisol, Luvisol and Andosol) × fertilization (with (+P) and without (-P) phosphorus); and b) double interaction: maize genotypes (Puma, Mushito and Chalqueño) × AMF community (Vertisol, Luvisol and Andosol). 55

Capítulo 4. Field populations of arbuscular mycorrhizal fungi regulate water stress response in maize

Figure 2. Effect of irrigation and inoculation of AMF on the stomatal conductance of three maize races (a); the interaction race of maize-HMA (b) and race of maize -irrigation (c) on the photosynthetic efficiency of the genotypes hybrid, Chalqueño and Mushito. 77

Figure 3 Plant growth variables of two genotypes of native and hybrid maize inoculum ted with native AMF and irrigated at 65 and 100% of the field capacity of the soil. a) shoot fresh weight b) root fresh weight c) total plant fresh weight. All of them show the estimated mean from n = 6 and an LDS test with $p < 0.05$ 78

Figure 4 Oxidative damage to lipids estimated as peroxide content in shoot (a) roots (b) and MDA (malondialdehyde) in shoot (c) and roots (d, e) of three maize genotypes irrigated at 65 and 100% of CC and inoculum ted with native AMF. The genotypes of maize are identified as: Hib = hybrid, Mus = Mushito, Cha = Chalqueño. All the graphs were constructed from the ANOVA results and the average value is shown with standard error bars estimated from n = 3 and analyzed with an LSD test with $p < 0.05$ 79

Figure 5 Metabolites of drought stress response estimated as glutathione content (mmol g⁻¹) in the shoot (a and b) and roots (c); and proline in shoot (d) and roots (e, f) of three genotypes of maize (Hib = hybrid, Mus = Mushito, Cha = Chalqueño) inoculum ted with native AMF and irrigated at 65 and 100% field capacity. All the graphs were constructed from the ANOVA results and the average value is shown with standard error bars estimated from n = 3 and analyzed with an LSD test with $p < 0.05$ 80

Figure 6 AMF roots colonization of three maize genotypes irrigated at 65 and 100% field capacity. The average value is shown with standard error bars estimated from n = 6 and analyzed with an LSD test with $p < 0.05$ 81

Capítulo 5. Importancia de los HMA nativos de un Vertisol en la producción y calidad del grano de tres genotipos de maíz

Figura 1 Peso seco del follaje de tres genotipos de maíz (Antílope, H440 y Ancho) para las etapas de crecimiento V6 (a, b), floración (c) y senescencia (d), cultivado en un Vertisol bajo condiciones de campo. La colonización micorrícica arbuscular fue controlada con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-

fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p<0.05$ 99

Figura 2 Largo (a, b), diámetro (c, d) y pesos de mazorca (e) y semillas (f) de tres genotipos de maíz (Antílope, H440 y Ancho), cultivado en un Vertisol bajo condiciones de campo. La colonización micorrícica arbuscular fue controlada con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p<0.05$ 100

Figura 3 Relación entre peso seco del follaje en senescencia: peso de mazorca (a) peso seco del follaje en senescencia: peso de semillas (b) y peso de mazorca: peso de semillas (c) de tres genotipos de maíz (Antílope, H440 y Ancho) cultivados en un Vertisol bajo condiciones de campo. La colonización micorrícica fue controlada con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p<0.05$ 101

Figura 4 Calidad de la semilla de tres genotipos de maíz (Antílope, H440 y Ancho). Concentración de grasas (a), proteína (b), fibra (c), cenizas (d) y carbohidratos (e, f). La colonización micorrícica arbuscular fue controlada con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p<0.05$ 102

Figura 5 Porcentaje de colonización micorrícica arbuscular en las raíces de las plantas de tres genotipos de maíz las etapas de crecimiento V6 (a) y floración (c). Colonización de otros microorganismos no micorrícicos en las etapas de crecimiento V6 (b) y floración (d, e). La colonización micorrícica fue suprimida con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p<0.05$ 103

Lista de cuadros

Capítulo 2. Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios.

Table 1. P values from analysis of variance of the main factors inoculum, N and P fertilization and their interactions for the variables shoot and root dry weight, shoot nutrients, response to rhizosphere microorganisms and AMF root colonization (n = 4).....26

Table 2. P values from analysis of variance of the main factors inoculum, N and P fertilization and their interactions for the variables abundance of microbial biomarker fatty acids expressed per unit dry soil or root (n = 4).....29

Table 3. Pearson correlation analysis between plant and microbial variables measured at harvest of eight-week-old maize plants with all 64 experimental units32

Capítulo 3. Mycorrhiza growth response in maize depends on soil type, mineral P fertilization, maize genotype and field populations of arbuscular mycorrhizal fungi

Table 1 Physical and chemistry properties of Vertisol, Andosol and Luvisol used for maize growth and AMF inoculum propagation 50

Table 2 Species of AMF recovered from inoculum in terms of AMF spores, which corresponds to rhizosphere soil from maize AMF tramp cultures propagated with rhizosphere soil collected in maize fields in Guanajuato, Michoacán and Estado de Mexico, México (Alvarado-Herrejón et al., 2018) 50

Table 3 P-values of analysis of variance estimated in the two experiments 51

Capítulo 4. Field populations of arbuscular mycorrhizal fungi regulate water stress response in maize

Table 1 ANOVA analysis for vegetable growth and photosynthesis variables of three maize races inoculum ted with native AMF and irrigated at 56 and 100% of CC estimated from n = 6. * p <0.05. Variables of photosynthesis were estimates before harvest..... 76

Table 2 ANOVA of physiological responses variables to irrigation limitation of three maize races inoculum ted with native AMF and irrigated at 56 and 100% of CC estimated from n = 6. * p <0.05. Lipid peroxidation expressed as MDA (malondialdehyde) and peroxides. Metabolites of response to drought stress proline and glutathione 76

Capítulo 5. Importancia de los HMA nativos de un Vertisol en la producción y calidad del grano de tres genotipos de maíz

Cuadro 1 Valores de p ANOVA para el análisis del efecto de los factores genotipo de maíz, fertilización y benomyl en las variables del crecimiento de maíz en tres tiempos y caracterización de la mazorca a partir de $n=4$ y una $p<0.05$ 98

Cuadro 2 . Valores de p ANOVA para el análisis de los factores genotipo de maíz, fertilización y benomyl para las variables de la calidad del grano estimadas a partir de $n=4$ ($p<0.05$). 98

Resumen

En la presente tesis se analizó: 1) El efecto de la fertilización nitrogenada y fosforada sola y en combinación sobre la contribución de los microorganismos rizosféricos nativos en el crecimiento y nutrición del maíz; 2) ¿Cómo los grupos de suelos y genotipos de maíz pueden influir la simbiosis micorrícica?; 3) La regulación de estrés hídrico por hongos micorrícicos arbusculares (HMA) nativos en diferentes genotipos de maíz; y 4) ¿Cómo los HMA de un Vertisol pueden contribuir a mejorar la producción y calidad de la semilla maíces nativos e híbridos?

Se llevaron a cabo cuatro experimentos en laboratorio (Capítulos 2 al 4) y un experimento en condiciones de campo en un Vertisol (Capítulo 4). Para los experimentos en laboratorio se utilizó un inóculo de microorganismos rizosféricos propagado en invernadero utilizando plantas de maíz. El inóculo se realizó a partir de suelo rizosférico de plantas de maíz cultivadas en un Vertisol, Andosol y Luvisol de las localidades de Guadalupe Paso Blanco, Irapuato (Gto), San Pedro Ixtayoc, Texcoco (Edo Mex) y Napízaro, Erongarícuaro (Mich) respectivamente. En el experimento en campo, las poblaciones nativas de HMA fueron inhibidas a través de la aplicación de Benomyl®, que es un fungicida no específico, pero es el más utilizado en estudios de HMA.

Se destaca que tanto la fertilización nitrogenada como la fosforada modifican la función de los microorganismos nativos en términos de su efecto en la nutrición y el crecimiento del maíz. Los HMA nativos de un Andosol, un Vertisol y un Luvisol pueden reducir la deficiencia de fósforo, pero no la de nitrógeno. Además, la fertilización con ambos, nitrógeno y fósforo, estimuló una reducción del crecimiento de las plantas de maíz atribuida a un parasitismo entre el maíz y los HMA.

Los HMA nativos tuvieron un efecto contrastante en la estimulación de mecanismos de respuesta fisiológica a la sequía entre dos maíces nativos y un híbrido. Los HMA inoculados en un genotipo híbrido redujeron la síntesis de prolina y antioxidantes a niveles similares a las plantas bien regadas. En contraste, en los maíces nativos, la síntesis de prolina y antioxidantes su mayor cuando fueron inoculados con HMA que las plantas control.

En el experimento en campo, en un Vertisol, el aporte de los HMA nativos en el desarrollo, producción y calidad del grano de maíz depende de la etapa del crecimiento, de la fertilización mineral y del genotipo. Además, los resultados observados mostraron que la simbiosis micorrícica puede ir en un continuo de interacciones bióticas del mutualismo al parasitismo dependiendo de la variable respuesta analizada.

Se concluyó que los microorganismos rizosféricos nativos estimulan el crecimiento de diferentes genotipos de maíz bajo condiciones limitantes de fósforo pero no de nitrógeno. Además, los HMA estimularon un mayor crecimiento del maíz en un Andosol. Así mismo, la colonización de HMA nativos redujo el estrés hídrico únicamente en el genotipo híbrido. Finalmente, bajo condiciones de campo, los HMA nativos de un Vertisol estimularon una mayor producción de fibras y carbohidratos en los genotipos de maíz híbridos y nativos respectivamente.

Abstract

We analyzed: 1) The effect of nitrogen and phosphorus fertilization single and combined on the contribution of native rhizospheric microorganisms; 2) How soil group and maize genotypes can modify the mycorrhizal symbiosis?; 3) The regulation of water stress by native Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) in different maize genotypes; and 4) How the AMF from a Vertisol can contribute to the production and quality of native and hybrid maize seed.

Four laboratory experiments were carried out (chapters 2 to 4) and one experiment under field conditions in a Vertisol was carried (chapter 4). The inoculum for laboratory experiments consisted of rhizospheric microorganisms propagated in greenhouse using maize plants. The inoculum was made from rhizospheric soil of maize plants grown in a Vertisol, Andosol and Luvisol from the towns of Guadalupe Paso Blanco, Irapuato (Gto), San Pedro Ixtayoc, Texcoco (Edo Mex) and Napízaro, Erongarícuaro (Mich) respectively. In the field experiment, the native populations of AMF were managed through the application of benomyl, which is a non-specific fungicide, but it is the most used in studies of AMF.

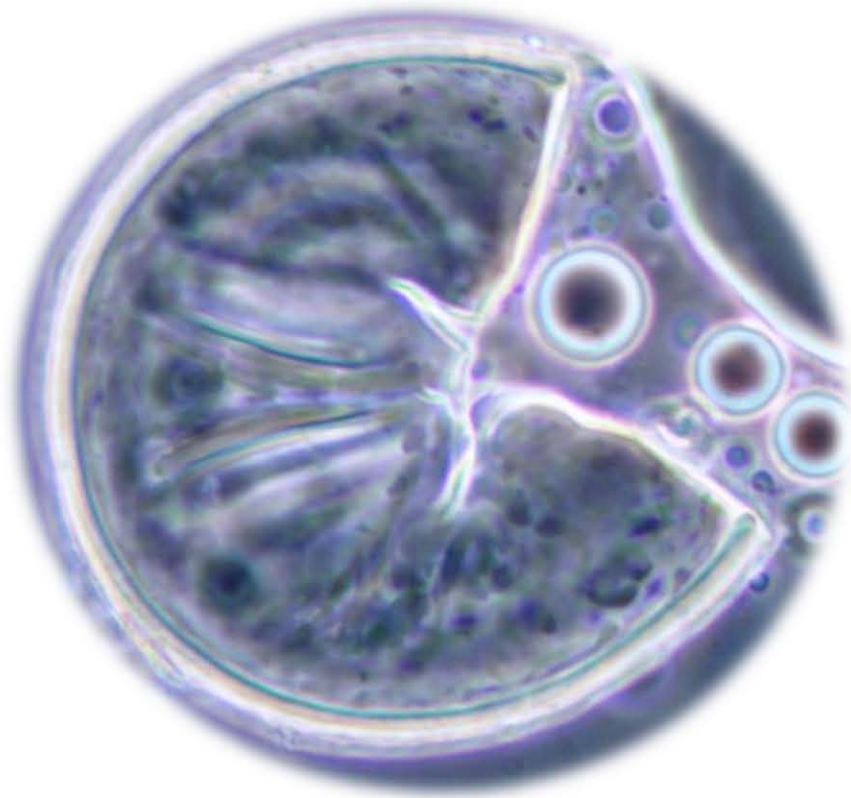
From this work it is possible to emphasize that both nitrogen and phosphorus fertilization can modify the function of native microorganisms on the nutrition and growth of maize. Native AMF can reduce phosphorus deficiency, but not of nitrogen. In addition, fertilization with both nitrogen and phosphorus promoted growth depressions of maize by microorganisms. It was observed that the native AMF populations reduced the phosphorus deficiency in the soil (Andosol) with the phosphorus fertilization.

The native AMF had a contrasting effect in the stimulation of mechanisms of physiological response to drought. The AMF inoculated in a hybrid genotype maize reduced the symptoms of water stress to levels similar to well-watered plants. In contrast, in two native maize, the mycorrhizal symbiosis stimulated a greater presence of water stress with respect to plants without inoculum.

In the field experiment, the contribution of the native AMF in the development, production and quality of the maize depends on the stage of growth, mineral fertilization and genotype. In addition, the effects of the mycorrhizal symbiosis behave like antagonist, mutualist or neutralist depending of the response variable analyzed.

We conclude that native rhizospheric microorganisms stimulate the growth of different maize genotypes under soil limiting phosphorus conditions but not of nitrogen. In addition, the native AMF stimulated greater maize growth in Andosol. Likewise, native AMF colonization reduced water stress only in the hybrid genotype. Finally, under field conditions, the Vertisol native AMF stimulated higher seed fiber and carbohydrate production in the hybrid and native corn genotypes respectively.

Capítulo 1. Introducción general



Introducción general

En la actualidad, existen dos grandes paradigmas en la producción de alimentos: la convencional y la alternativa (Sámano-Rentería, 2013). La agricultura convencional nació a partir de la Revolución Verde como estrategia global para proveer alimentos a la creciente población mundial. La Revolución Verde consta de cinco tecnologías: el desarrollo de cultivos híbridos para incrementar el rendimiento de los cultivos, el uso de fertilizantes minerales, el desarrollo de obras hidráulicas para la implementación de distritos de riego, el uso de maquinaria y pesticidas para el control de plagas, enfermedades y malezas (Gliessman et al., 2007). Este modelo de agricultura aun cuando satisfizo las demandas de la producción de alimentos, ha traído consigo grandes problemas ambientales como la emisión de gases de efecto invernadero, la degradación de los suelos, la reducción de la biodiversidad, la contaminación de cuerpos acuíferos y el cambio de uso de suelo (Pingali, 2012). Ante este escenario, la agricultura alternativa ofrece múltiples expresiones de producción de alimentos desde una perspectiva más sustentable. Algunos de los modelos productivos que incluye son la agricultura orgánica, la permacultura y la agricultura biológica. La agricultura alternativa intenta integrar elementos sociales, ambientales y productivos con el fin de incrementar la sustentabilidad de los agroecosistemas (Altieri et al., 2015).

Una de las herramientas tecnológicas para reducir el uso de insumos agrícolas es el uso de los microorganismos benéficos del suelo, los cuales tienen múltiples funciones en los agroecosistemas como el control de plagas y la aminoración de diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Estas funciones pueden ser aprovechadas en la agricultura para reducir el uso de insumos e incrementar la sustentabilidad de los agroecosistemas (Larsen et al., 2015). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son un grupo de microorganismos biotrofos obligados que se establecen dentro de las raíces de las plantas y pueden realizar múltiples funciones como la facilitación de nutrimentos y la protección contra estrés hídrico (Smith y Smith, 2011).

La humedad y la disponibilidad de nutrimentos para las plantas son dos de los elementos más limitantes para la producción de alimentos (Gliessman et al., 2007). La disponibilidad

de agua es la mayor limitante para la producción de agrícola y, bajo el contexto del cambio climático, la agricultura de temporal se vuelve más vulnerable ante los cambios del régimen de lluvias (Vörösmarty et al., 2000). Bajo condiciones de estrés hídrico, los HMA confieren regulación osmótica a las raíces y a las hojas a través de la acumulación de prolina, acuaporinas, trehalosa, con el fin de proteger los tejidos y el sistema fotosintético (Aroca et al., 2012; Ruiz-Lozano, 2003).

Por otro lado, la fertilización (mineral u orgánica) ha incrementado el rendimiento de los cultivos a través de la suplementación de nutrimentos disponibles. Pero también, el mal manejo de los fertilizantes tiene impactos negativos en los ecosistemas como la eutrofización de los cuerpos de agua, la contaminación derivada de la fabricación o extracción de minerales y cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos (Tilman et al., 2002). Específicamente, la producción de fertilizantes nitrogenados demanda una alta energía para su síntesis a partir del nitrógeno atmosférico (Tallaksen et al., 2015). La producción de fertilizantes fosforados está limitada a los yacimientos de roca fosfórica de algunas partes del mundo (Liu et al., 2008). Estas condiciones colocan a la agricultura, en especial a la campesina, en una situación vulnerable debido a que la disponibilidad y el acceso a los fertilizantes depende de factores políticos, ambientales o económicos más allá de la capacidad intrínseca de los agroecosistemas para mantener el ciclaje de sus nutrimentos (Shiva, 2016). La simbiosis micorrícica podría ser un mecanismo biológico mediante el cual se podría incrementar la sustentabilidad de los agroecosistemas a través de la reducción de fertilizantes y la protección contra estrés biótico o abiótico (sequía) (Gianinazzi et al., 2010).

Por su alta afinidad con microorganismos rizosféricos, y por su importancia cultural, económica y alimenticia, el maíz representa un buen modelo de estudio teórico para el análisis de las interacciones micorrícicas en un contexto de sistemas agrícolas. Además, el maíz tiene alta afinidad con diferentes grupos microbianos que contribuyen en su nutrición y en la reducción de diferentes tipos de estrés, por lo tanto, es importante conocer como los elementos bióticos, abióticos y las prácticas agrícolas pueden influir sobre las interacciones micorrícicas.

La rizósfera

La forma más común para definir la rizósfera, es como la zona que está influenciada por las raíces y los componentes provenientes de ellas, así como la interacción con el ambiente (Lynch y de Leij, 2012). Este concepto permite considerar elementos ambientales como las características físicas, químicas y biológicas del suelo, su humedad e incluso, las prácticas de manejo agrícola (Figura 1) (Morgan et al., 2005). Uno de los principales servicios ecosistémicos que realizan los microorganismos rizosféricos es el reciclaje de nutrimentos a través de procesos como la mineralización de materia orgánica, la solubilización de minerales, la fijación de nitrógeno y la meteorización biológica del material parental (Drinkwater y Snapp, 2007). Una forma de conservar el nitrógeno y el fósforo en el suelo es mantenerlos inmovilizados en la biomasa microbiana. Para esto, los HMA pueden absorber amonio y ortofosfatos del suelo y almacenarlos en la biomasa intra y extraradical o bien transportarlo a las plantas (Cavagnaro *et la al.*, 2015).

Suelo

El suelo es un cuerpo natural en la superficie de la tierra compuesto por materiales minerales, materia orgánica, agua y aire. El suelo es el resultado evolutivo de procesos pedogenéticos (origen y tipo de minerales, propiedades químicas, físicas y biológicas) que permite sustentar los ecosistemas terrestres y agrícolas (Osman, 2013). La base referencial mundial del recurso suelo reconoció en 2014, a 32 grupos de suelos clasificados con base en su desarrollo o tiempo de formación y sus propiedades físicas y químicas. Todos los suelos están formados por horizontes o capas que se diferencian del material parental y que son el resultado de adiciones, pérdidas, migraciones y transformaciones de materia orgánica e inorgánica (IUSS Working Group WRB, 2014).

Desde el punto de vista de los servicios ecosistémicos, los suelos tienen funciones que permiten la transformación y el reciclaje de materiales y nutrientes, la purificación natural agua y aire, puede ser un archivo histórico, banco de recursos, proporciona anclaje a las plantas, alberga gran diversidad biológica y puede sustentar la producción alimentos (Bautista et al., 2016; Gallegos-Tavera et al., 2016; Lehmann y Stahr, 2008). El suelo alberga y soporta gran diversidad biológica. En este sentido, la macro, micro y mesofauna del suelo influye en algunas de propiedades edáficas como la porosidad, la capacidad de enraizamiento, el pH, la mineralización de materia orgánica, y la fertilidad (Osman, 2013).

Los microorganismos son un componente fundamental del suelo y sus funciones (Drinkwater y Snapp, 2007). En general, las bacterias y los hongos son los microorganismos encargados de realizar la despolimerización y mineralización de la materia orgánica, procesos fundamentales para mantener la fertilidad del suelo. Los hongos tienen mayor afinidad para degradar compuestos orgánicos como ligninas y hemicelulosas, mientras que las bacterias se correlacionan con la mineralización de celulosa, hemicelulosa y compuestos proteínicos (Romaní et al., 2006). Sin embargo, es importante considerar que la capacidad de degradación de la materia orgánica no sólo depende de la diversidad funcional de los microorganismos del suelo, sino de la interacción de estos con la calidad y cantidad de la materia orgánica y el ambiente (Hättenschwiler et al., 2005).

Hongos micorrícicos arbusculares

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), son simbioses obligados que requieren establecer asociación micorrícica con las raíces de las plantas para completar su ciclo de vida. El concepto de “micorriza” etimológicamente se forma del griego “Mykos” (hongo) y del latín “Rhiza” (raíz) (Smith y Read, 2008). En la presente tesis se entiende como simbiosis micorrícica, a la interacción entre los HMA y las plantas de maíz.

Las asociaciones micorrícicas o micorrizas se establecen con alrededor del 80% de las familias de las plantas terrestres. Los HMA se distribuyen en la mayoría de los ecosistemas y colonizan un gran número de especies de gimnospermas, angiospermas y pteridofitas (Smith y Smith, 2011). Los HMA pertenecen al phylum Glomeromycota, con 14 familias y 29 géneros de los cuales *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Scutellospora* son los más estudiados (Oehl et al., 2011).

En las asociaciones micorrícicas, las plantas ofrecen a los hongos un nicho y carbono derivado de la fotosíntesis. Por su parte, los hongos transportan minerales del suelo a su hospedero principalmente fósforo, aunque también se ha reportado que pueden transportar nitrógeno, potasio, azufre, manganeso, zinc, hierro, boro, calcio, magnesio y aluminio. Además, los HMA también tienen la capacidad de reducir diversos tipos de estrés biótico y abiótico de las plantas (Clark y Zeto, 2000; Jeffries et al., 2003).

El transporte de nutrientes del suelo a las plantas se realiza a través del micelio externo, que funciona como una extensión de las raíces para incrementar la superficie de contacto con el suelo. Se ha demostrado que existe una correlación entre el volumen de micelio micorrícico y la cantidad de fósforo isotópico transportado (Sawers et al., 2017). La actividad funcional de los HMA está fuertemente regulada por la capacidad de las plantas para proveer fotosintatos a los hongos y por la capacidad de los HMA de sintetizar enzimas de alta afinidad con el fósforo (Yang et al., 2018). La capacidad de las hifas extraradicales para absorber fósforo depende de las H⁺ATP-ases localizadas en las membranas y transportadores de alta afinidad del citoplasma de las hifas (Ferrol et al., 2002). Una vez que el fósforo se encuentra en el citoplasma se transforma en polifosfatos que pueden ser almacenados en vacuolas móviles (Munkvold et al., 2004). Finalmente, el intercambio de

fósforo de los HMA a las plantas se realiza mediante transporte activo de ATP-asas localizadas en los arbusculos y en el apoplasto. Por su parte, las plantas transfieren a los hongos hexosas (glucosas) de forma pasiva a través del contacto membrana-membrana (Ferrol et al., 2002).

En la presente tesis, se entiende por interacciones micorrícicas como a la interacción biótica entre los HMA nativos y las raíces de plantas de maíz susceptibles a ser colonizadas. Una vez establecida la asociación, los hongos deben desarrollar estructuras funcionales (micelio, arbusculos, vesículas y esporas) y el hospedero no debe sufrir daños en sus órganos. Este concepto difiere parcialmente del tradicional, en el cual se considera que la simbiosis micorrícica es mutualista (Smith y Read, 2008). Existen evidencias bajo condiciones controladas, en sistemas naturales y agroecosistemas que sugieren que la simbiosis micorrícica puede establecerse en un continuo de interacciones desde el mutualismo al parasitismo (Johnson et al., 2015; Kogel et al., 2006). Sin embargo, aún no son claros los elementos del ambiente (propiedades del suelo, clima, etc.) o las prácticas de manejo agrícola (fertilización, irrigación, uso de agroquímicos, etc.) que pueden modificar o influir en la simbiosis micorrícica.

Prácticas de manejo agrícola que modifican la simbiosis micorrícica

Las prácticas de manejo agrícola pueden definirse como aquellas actividades antrópicas encaminadas a generar las condiciones y cuidados necesarios para el crecimiento y producción de los cultivos. En este sentido, algunas de las prácticas agrícolas que más impactan en las poblaciones nativas de HMA son el arado, la fertilización mineral u orgánica, el uso de pesticidas, la selección del genotipo de maíz e incluso la irrigación (Larsen et al., 2014). La presente tesis se enfoca entender como la simbiosis micorrícica arbuscular, puede ser influida por la fertilización mineral, la irrigación y el genotipo de maíz, debido a que la disponibilidad de agua, nutrientes y variabilidad de planta son las principales limitantes para la producción de alimentos.

Irrigación

En la agricultura existe una compleja gama de tecnologías que van desde las tradicionales donde la principal fuente de energía es la mano de obra familiar, hasta las más tecnificadas

en las que se genera artificialmente el ambiente óptimo para el desarrollo de las plantas (Altieri et al., 2015).

La productividad de cualquier agroecosistema está limitada por el acceso al agua. En general, los países en vías del desarrollo tienen una escasa infraestructura de irrigación, por lo que la mayoría de la agricultura es de temporal. En el caso de especies como el maíz, las plantas pueden desarrollar diferentes mecanismos para hacer frente al estrés hídrico como el cierre de estomas, la síntesis de moléculas de osmoprotección (carbohidratos, aminoácidos, proteínas, etc.), los cambios en el desarrollo y la arquitectura de las raíces y la asociación con HMA (Aroca et al., 2012; Augé et al., 2014). Se ha observado que durante periodos de estrés hídrico, las plantas de maíz inoculadas con HMA mejoraron la concentración de clorofila *a* y *b*, la tasa fotosintética neta y por ende tuvieron una mayor acumulación de biomasa durante periodos de estrés hídrico (Bárzana et al., 2015). Las asociaciones micorrícicas durante periodos de estrés hídrico estimulan la acumulación de trealosa, acupurinas, prolina y antioxidantes solubles en las raíces, que fungen de forma indirecta como reguladores osmóticos (Ruiz-Lozano et al., 2012). No obstante, estos mecanismos de respuesta a la sequía inducidos por los HMA también podrían estar asociados con la susceptibilidad del genotipo de maíz al estrés hídrico (Quiroga et al., 2017).

Genotipo de maíz

La selección del genotipo de maíz es una de las prácticas agrícolas que debe tener una atención especial, dado que el establecimiento y función de la simbiosis micorrícica arbuscular puede depender de la interacción entre los HMA, sus hospederos y el ambiente (Johnson y Graham, 2013). Además de la influencia del genotipo de maíz, es posible que el efecto de los HMA sobre sus hospederos varíe incluso al comparar entre cepas de la misma especie, consorcios o poblaciones nativas (Ortas y Akpınar, 2011).

Actualmente no es muy clara la relación entre la domesticación y/o mejoramiento del maíz y su dependencia a la simbiosis micorrícica. Por ejemplo, bajo condiciones de fertilización media (65 mg kg^{-1}), la dependencia de un maíz híbrido comercial a la asociación micorrícica fue significativamente menor que la dependencia de cinco genotipos de maíz nativo de la región de los Tuxtlas. Sin embargo, cuando la fertilización fue baja (5 mg

kg⁻¹), tres de los cinco maíces nativos evaluados y el genotipo híbrido, mostraron una mayor afinidad a la simbiosis micorrícica para adquirir fósforo (Sangabriel-Conde et al., 2014). En otro trabajo, reportaron efectos contrastantes en el crecimiento de cuatro genotipos de maíz híbrido con respecto a su colonización micorrícica, a la longitud del micelio, la biomasa y el contenido de fósforo de las plantas inoculadas con *Rhizophagus irregularis* (HMA) y crecidos en un gradiente de fertilización fosforada (Chu et al., 2013).

Fertilización mineral

La fertilidad del suelo es uno de los elementos del ambiente con mayor influencia sobre la simbiosis micorrícica. En un suelo con baja fertilidad, las plantas son más dependientes de la simbiosis micorrícica para obtener los nutrientes limitantes para su desarrollo; mientras que cuando la disponibilidad de nutrientes es alta (por aplicación de fertilizantes) hay una reducción del crecimiento en términos de biomasa de los HMA, debido a que las plantas asignan más carbono al crecimiento vegetal que al mantenimiento de la simbiosis (Treseder y Allen, 2002).

La fertilización fosforada puede modificar la contribución de cepas y poblaciones nativas de HMA en la nutrición del maíz (Gavito y Varela, 1995). En este sentido, cuando no hay limitación de nutrientes, algunas especies de la familia Gigasporaceae (HMA) se reducen drásticamente por efecto de la fertilización. En contraste, cuando el fósforo del suelo es limitante se incrementa la densidad de esporas de las poblaciones de HMA nativos. Lo anterior sugiere que los HMA nativos podrían adaptarse a las prácticas de fertilización en los sistemas agrícolas.

Existen múltiples reportes que muestran que la fertilización mineral u orgánica modifica la composición de las poblaciones nativas de HMA y otros microorganismos rizosféricos (Thomson et al., 1992; Aguilar et al., 2017; Ma et al., 2018). Por ejemplo, un experimento con diferentes regímenes de fertilización mineral y orgánica (estiércol) mostró que ambos tipos de fertilización se correlacionan con la composición de la comunidad de HMA nativos de la rizósfera de maíz. Se encontró que los compuestos del estiércol como 2-etilnaftaleno y 2,6,10-trimetiltetradecano tuvieron una correlación negativa con la abundancia relativa de *Glomus*, mientras que el 3-metilbifenilo mostró una correlación positiva con *Rhizophagus*. Además, se reportó que el índice de cobertura de abundancia (ACE-index) tuvo

significativamente mayor diversidad cuando se aplicó estiércol de manera individual en comparación con la fertilización mineral (Zhu et al., 2016).

Por otro lado, el crecimiento de cinco genotipos de maíz co-inoculados con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Azospirillum lipoferum*, *A. amazonense* y *Burkholderia sp.*) y HMA (*Glomus clarum*) fue similar entre plantas micorrizadas, pero estas tuvieron al menos el doble de crecimiento que las control. Además la interacción entre ambos grupos microbianos estimuló un mayor número de unidades formadores de colonias de las bacterias (Miyachi et al., 2008). Lo anterior cobra relevancia al considerar que, condiciones de campo, las interacciones micorrícicas están influenciadas tanto por elementos bióticos (vegetación, macro, micro y meso fauna, etc.) y abióticos (suelo y sus propiedades, clima, etc.) del ambiente, como por las prácticas de manejo agrícolas. Con base en todo lo anterior se construyó el modelo de estudio de este trabajo (Figura 1).

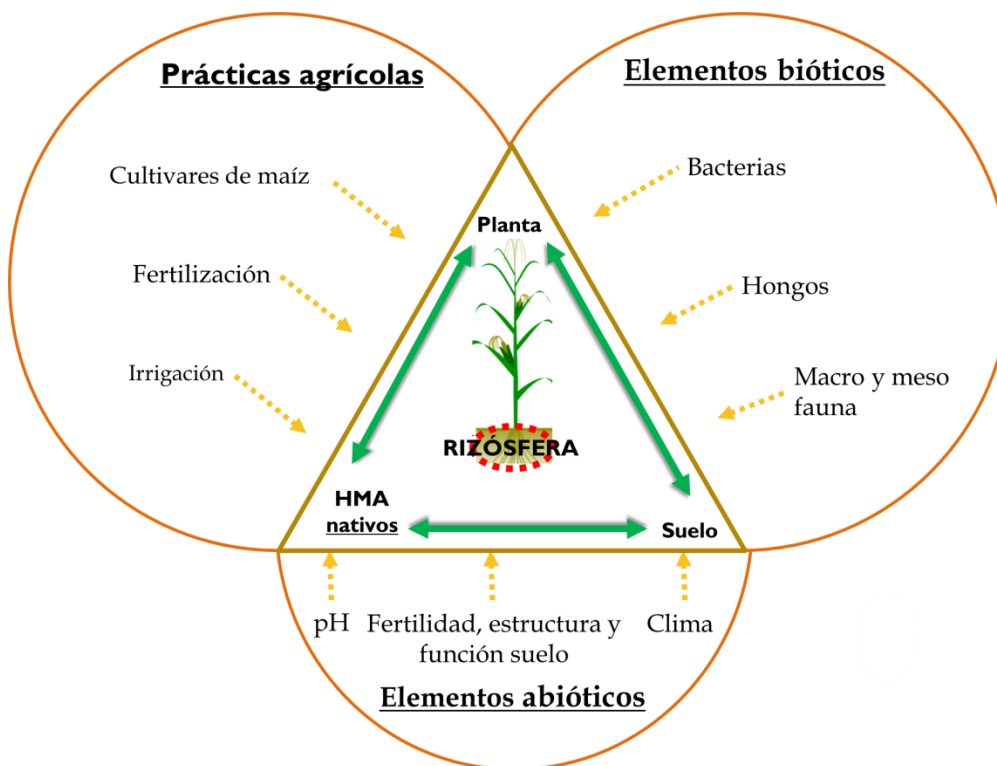


Figura 1 Modelo de estudio de esta tesis doctoral. Se muestran los tres componentes de la rizósfera de maíz (planta-suelo-microorganismo), los elementos bióticos, abióticos y las prácticas de manejo que pueden influir sobre la simbiosis micorrícica arbuscular y que son analizados durante los capítulos experimentales de presente investigación.

Hipótesis

El efecto de las poblaciones nativas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la estimulación el crecimiento, la productividad, la calidad de la semilla y el amortiguamiento del estrés hídrico del maíz dependerán de: 1) **Genotipo de maíz**; las variedades locales tendrán dependerán menos de la simbiosis micorrícica para adquirir fósforo y reducir el estrés hídrico que los genotipos híbridos. 2) **Fertilización mineral** sin fósforo, estimulará una mayor contribución de los HMA nativos en el crecimiento, productividad y calidad de la semilla de diferentes genotipos de maíz. 3) **El grupo de suelo**; los HMA nativos estimularán un mayor crecimiento del maíz en los suelos con menor concentración de fósforo.

Objetivo general

Analizar cómo las prácticas agrícolas (cultivar de maíz, fertilización mineral e irrigación) y las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, influyen en la contribución de los HMA nativos en la mitigación estrés hídrico, adquisición de nutrientes , desarrollo, producción y calidad de la semilla del maíz

Objetivos específicos

- 1) Examinar cómo la deficiencia de nitrógeno o fósforo puede modificar la interacción entre los HMA nativos y las plantas de maíz.
- 2) Evaluar cómo las interacciones micorrícicas pueden variar en función del genotipo de maíz bajo condiciones de deficiencia de nutrientes y estrés hídrico.
- 3) Analizar el efecto de las propiedades físicas, químicas y biológicas de diferentes suelos en la interacción micorrícica del maíz.
- 4) Evaluar la contribución de los HMA nativos de un Vertisol en el crecimiento, rendimiento y calidad de la semilla de tres diferentes genotipos de maíz, bajo condiciones de campo.

Estructura de la tesis

Para responder a los objetivos planteados, la tesis se estructura en un capítulo de introducción general, cuatro capítulos experimentales (Capítulos 2 al 5) y un capítulo de discusión y conclusiones generales.

Capítulo 2. Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios.

Este capítulo fue publicado en la revista *Rhizosphere*, y tuvo como objetivo de examinar la contribución de tres comunidades de microorganismos rizosféricos nativos (Andosol, Vertisol y Luvisol) en términos del crecimiento y nutrición de maíz en condiciones limitantes de nitrógeno y fósforo. Se realizó un experimento en macetas en invernadero con fertilización mineral completa (N y P), sin N, sin P y sin fertilización. Se encontró que las comunidades microbianas de la rizósfera de maíz promovieron el crecimiento de las plantas fertilizadas con N (limitación de P), mientras que se registraron respuestas negativas al crecimiento del maíz cuando la fertilización solo incluyó P (limitación de N) y de N y P (sin limitación de nutrientes). Se concluyó que la respuesta de la planta de maíz a comunidades microbianas de la rizósfera en términos de crecimiento y nutrición está fuertemente asociada con el equilibrio de la fertilización con N y P.

Capítulo 3. Interacciones antagonistas, neutralistas y mutualistas entre HMA nativos y el maíz son modificadas por la fertilización fosforada pero no por adaptación a su suelo de origen

En este capítulo se evaluó como las interacciones micorrícicas pueden ser modificadas por las propiedades del suelo y por el genotipo de maíz. Se incluyeron dos experimentos factoriales con tres factores cada uno: exp 1) F1 tipos de suelos (Guanajuato, Michoacán y Estado de México), F2 HMA (Irapuato, Napízaro y Texococo), F3 Fertilización (con y sin fósforo); exp 2) F1 tipos de suelos (Guanajuato, Michoacán y Estado de México), F2 Genotipo de maíz (Puma, Mushito y Chalqueño), F3 HMA (suelo desinfectado y no desinfectado). Se encontró que la limitación de fósforo promovió interacciones de neutrales

a mutualistas, mientras que la aplicación de fertilización fosforada estimuló las interacciones neutrales o antagónicas. Además, no se observaron indicios que sugieran una adaptación de los HMA a su suelo de origen ni al genotipo de maíz. Se concluyó que la simbiosis micorrícica puede reducir el uso de fertilizantes fosforados para el crecimiento del maíz.

Capítulo 4. Field populations of arbuscular mycorrhizal fungi regulate water stress response in maize.

Para determinar si las poblaciones nativas de HMA pueden reducir el estrés hídrico de tres genotipos de maíz, en este capítulo se realizó un experimento con tres factores: F1: Genotipo de maíz (Híbrido sensible, Nativo de Napízaro, Nativo de Texcoco); F2: HMA nativos (con y sin inóculo); F3: Estrés hídrico (65 y 85 % de capacidad de campo). Se encontró que los HMA tienen la capacidad de reducir el daño oxidativo estimado a partir de peróxidos y daño oxidativo a lípidos en follaje y raíces. Además, los HMA indujeron metabolitos de protección como azúcares y prolina en el genotipo híbrido. Sin embargo, la simbiosis micorrícica estimuló, en los genotipos nativos de HMA una mayor concentración de indicadores de estrés hídrico. Se concluyó que los HMA nativos tienen la capacidad de reducir el estrés hídrico cuando fueron inoculados solo en el genotipo híbrido.

Capítulo 5. Importancia de los HMA nativos de un Vertisol en la producción y calidad del grano de tres genotipos de maíz

Con objetivo de evaluar la contribución de los HMA nativos en el crecimiento, rendimiento y la calidad de la semilla de tres genotipos de maíz, se estableció un experimento en condiciones de campo. El experimento fue establecido en condiciones de temporal (junio-noviembre) en una parcela agrícola en un suelo clasificado como Vertisol y para controlar las poblaciones nativas de HMA se aplicó el fungicida Benomyl. Se evaluaron tres etapas del crecimiento del maíz (V6, floración y senescencia). La calidad de la semilla del maíz se evaluó en términos de grasas, proteínas, fibras y carbohidratos. El porcentaje de colonización micorrícica fue reducida por efecto del Benomyl para las etapas V6 y floración de crecimiento. El efecto de la aplicación de Benomyl y la fertilización mineral en el crecimiento de las plantas varió con respecto a la etapa de desarrollo y al genotipo de maíz. La aplicación de Benomyl en los tratamientos fertilizados con NK promovió y

redujo el crecimiento de los maíces Antílope y H440, respectivamente. La aplicación de benomyl en ausencia de fertilización disminuyó el peso de las semillas en los tres genotipos de maíz. La aplicación de benomyl redujo el contenido de grasas del genotipo H440 en ausencia de fertilización, de igual manera, todos los genotipos de maíz redujeron el contenido de proteínas en la semilla cuando no se fertilizó. El benomyl incrementó y redujo la concentración de fibra en la semilla del genotipo Ancho y en ambos genotipos híbridos, respectivamente. La semilla del genotipo Ancho acumuló una mayor cantidad de carbohidratos que la semilla de ambos genotipos híbridos. Se concluyó que los HMA nativos de un Vertisol pueden mejorar el rendimiento y calidad del grano de sus hospederos, pero su efecto depende del genotipo de maíz y de la variable estudiada.

Capítulo 6. Discusión y conclusiones generales

En este capítulo se presentan una discusión integral de los resultados más relevantes de la investigación, así como las conclusiones generales de la investigación. A partir de la integración de los resultados más importantes de los capítulos de la tesis, se presenta también una pequeña prospectiva a futuro.

Referencias bibliográficas

- Aguilar, R., Carreón-Abud, Y., López-Carmona, D., Larsen, J., 2017. Organic fertilizers alter the composition of pathogens and arbuscular mycorrhizal fungi in maize roots. *J. Phytopathol.* 165, 448–454. <https://doi.org/10.1111/jph.12579>
- Akyol, T.Y., Niwa, R., Hirakawa, H., Maruyama, H., Sato, T., Suzuki, T., Fukunaga, A., Sato, T., Yoshida, S., Tawaraya, K., Saito, M., Ezawa, T., Sato, S., 2018. Impact of introduction of arbuscular mycorrhizal fungi on the root microbial community in agricultural fields. *Microbes Env.* 00, 0-000. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18109>
- Al-Karaki, G.N., Clark, R.B., 1999. Mycorrhizal influence on protein and lipid of durum wheat grown at different soil phosphorus levels. *Mycorrhiza* 9, 97–101. <https://doi.org/10.1007/s005720050006>
- Altieri, M.A., Nicholls, C.I., Henao, A., Lana, M.A., 2015. Agroecology and the design of climate change-resilient farming systems. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 869–890. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0285-2>
- Alvarado-Herrejón, M., Larsen, J., Gavito, M.E., Jaramillo-López, P.F., Vestberg, M., Martínez-Trujillo, M., Carreón-Abud, Y., 2018. Relation between arbuscular mycorrhizal fungi, root-lesion nematodes and soil characteristics in maize agroecosystems. *Appl. Soil Ecol.* <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2018.10.019>
- An, G.H., Kobayashi, S., Enoki, H., Sonobe, K., Muraki, M., Karasawa, T., Ezawa, T., 2010. How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasm. *Plant Soil* 327, 441–453. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0073-3>
- Anjum, S.A., Tanveer, M., Ashraf, U., Hussain, S., Shahzad, B., Khan, I., Wang, L., 2016. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 17132–17141. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6894-8>
- Armada, E., Azcón, R., López-Castillo, O.M., Calvo-Polanco, M., Ruiz-Lozano, J.M., 2015. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought

- conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 90, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.004>
- Aroca, R., Irigoyen, J.J., Sanchez-Diaz, M., 2003. Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. *Physiol. Plant.* 117, 540–549. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00065.x>
- Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J.M., 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* 63, 43–57. <https://doi.org/10.1093/jxb/err266>
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2005.12.006>
- Augé, R.M., Toler, H.D., Saxton, A.M., 2014. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25, 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0585-4>
- Bárzana, G., Aroca, R., Ruiz-Lozano, J.M., 2015. Localized and non-localized effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on accumulation of osmolytes and aquaporins and on antioxidant systems in maize plants subjected to total or partial root drying. *Plant, Cell Environ.* 38, 1613–1627. <https://doi.org/10.1111/pce.12507>
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Battini, F., Grønlund, M., Agnolucci, M., Giovannetti, M., Jakobsen, I., 2017. Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Sci. Rep.* 7, 4686. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04959-0>
- Bautista, F., Gallegos-Tavera, A., Pacheco, A., 2016. Analysis of the environmental functions of soil profile data (Soil & Environment), 2a ed. Skiu, Mexico, D. F., <https://doi.org/https://www.actswithscience.com/se-2/>
- Bearden, B.N., Petersen, L., 2000. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vertisol. *Plant Soil* 218/2, 173–183. <https://doi.org/10.1023/A:1014923911324>
- Bedolla-Ochoa, C., Bautista, F., Gallegos, Á., 2018. Environmental functions of smallholder farmer land classes in the Zicuirán-Infiernillo Biosphere Reserve, Mexico Funciones ambientales de las clases de tierras campesinas en la Reserva de la Biosfera Zicuirán-Infiernillo, México. *Rev. Chapingo Ser. Ciencias For. y del Ambient.* 3, 265–274. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.09.058>
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758, 994–1003. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2006.02.015>
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.* 91, 179–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G., 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14, 89–97. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80929-2](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80929-2)
- Bravo-Espinosa, M., Barrera-Camacho, G., Mendoza, M., Sáenz-Reyes, T., Bahena-Juárez, F., Sánchez-Martínez, R. (Eds.), 2012. Contribuciones para el desarrollo sostenible de la cuenca del lago de Cuitzeo, Michoacán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México.
- Calderón-Vázquez, C., Alatorre-Cobos, F., Simpson-Williamson, J., Herrera-Estrella, L., 2009. Maize under phosphate limitation, en: *Handbook of maize: Its biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 381–404. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1_19
- Carballar-Hernández, S., Hernández-Cuevas, L.V., Montañón, N.M., Larsen, J., Ferrera-Cerrato, R., Taboada-Gaytán, O.R., Montiel-González, A.M., Alarcón, A., 2017. Native communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Capsicum annuum* L. respond to soil properties and agronomic management under field conditions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 245, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.004>
- Carpenter-Boggs, L., Loynachan, T.E., Stahl, P.D., 1995. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. *Soil Biol. Biochem.* 27, 1445–1451. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00075-P](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00075-P)
- Chami, D., Moujabber, M., 2016. Drought, climate change and sustainability of water in agriculture: A roadmap towards the NWRSS2. *S. Afr. J. Sci.* Volume 112, 104–107. <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150457>
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M., Jung, R., 2001. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125, 1206–1215. <https://doi.org/doi:10.1104/pp.125.3.1206>

- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., Reinhardt, D., 2018. Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi – from ecology to application. *Front. Plant Sci.* 9, 1270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>
- Chen, S.-K., Edwards, C.A., Subler, S., 2001. A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth. *Appl. Soil Ecol.* 18, 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00135-4)
- Chu, Q., Wang, X., Yang, Y., Chen, F., Zhang, F., Feng, G., 2013. Mycorrhizal responsiveness of maize (*Zea mays* L.) genotypes as related to releasing date and available P content in soil. *Mycorrhiza* 23, 497–505. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0492-0>
- Clark, R.B., Zeto, S.K., 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J. Plant Nutr.* 23, 867–902. <https://doi.org/10.1080/01904160009382068>
- Deng, Y., Feng, G., Chen, X., Zou, C., 2017. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization is considerable at optimal Olsen-P levels for maximized yields in an intensive wheat-maize cropping system. *F. Crop. Res.* 209, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2017.04.004>
- Drinkwater, L.E., Snapp, S.S., 2007. Nutrients in Agroecosystems: Rethinking the management paradigm. *Adv. Agron.* [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(04\)92003-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(04)92003-2)
- Duvick, D.N., 2005. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). *Adv. Agron.* 86, 83–145. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)86002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)86002-X)
- Elliott, J., Deryng, D., Müller, C., Frieler, K., Konzmann, M., Gerten, D., Glotter, M., Flörke, M., Wada, Y., Best, N., Eisner, S., Fekete, B.M., Folberth, C., Foster, I., Gosling, S.N., Haddeland, I., Khabarov, N., Ludwig, F., Masaki, Y., Olin, S., Rosenzweig, C., Ruane, A.C., Satoh, Y., Schmid, E., Stacke, T., Tang, Q., Wisser, D., 2014. Constraints and potentials of future irrigation water availability on agricultural production under climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 3239–3244. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222474110>
- Feddermann, N., Finlay, R., Boller, T., Elfstrand, M., 2010. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecol.* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.FUNECO.2009.07.003>
- Ferrol, N., Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., 2002. Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas, en: Smith, S.E., Smith, F.A. (Eds.), *Diversity and integration in mycorrhizas. Developments in plant and soil sciences.* Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 231–237. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1284-2_22
- Ferrol, N., Tamayo, E., Vargas, P., 2016. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *J. Exp. Bot.* 67, 6253–6265. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw403>
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka, M., 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176, 22–36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>
- Gallegos-Tavera, A., Bautista, F., Dubrovina, I., 2016. Software to evaluate the environmental functions of soils. *Softw. Syst.* 2, 195–200. <https://doi.org/10.15827/0236-235X.114.195-200>
- Gavito, M.E., Miller, M.H., 1998. Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant Soil* 198, 185–192. <https://doi.org/10.1023/A:1004314406653>
- Gavito, M.E., Varela, L., 1995. Response of “crillo” maize to single and mixed species inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi 76, 101–105. <https://doi.org/doi.org/10.1007/BF00017680>
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.N., van Tuinen, D., Redecker, D., Wipf, D., 2010. Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- Gliessman, S., Rosado-May, F., Guadarrama-Zugasti, C., Jedlicka, J., Cohn, A., Mendez, V., Cohen, R., Trujillo, L., Bacon, C., Jaffe, R., R, C., L, T., C, B., R, J., 2007. Agroecología : promoviendo una transición hacia la sostenibilidad. *Ecosistemas* 16, 13–23. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0065-6>
- González-Cañizares, P., Ramírez-Pedroso, J., Rivera-Espinosa, R., Hernández-Jiménez, A., Crespo-Flores, G., 2016. Efectividad de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en dos leguminosas forrajeras cultivadas en dos tipos de suelo. *Trop. Grasslands-Forrajes Trop.* 4, 82–90. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(4\)82-90](https://doi.org/10.17138/TGFT(4)82-90)
- Gryndler, M., Larsen, J., Hršelová, H., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., Kubát, J., 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular

- mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16, 159–166.
<https://doi.org/10.1007/s00572-005-0027-4>
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* 8, 89–193. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(85\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0098-2997(85)90001-9)
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, cell Environ.* 21, 535–553. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x>
- Hättenschwiler, S., Tiunov, A. V., Scheu, S., 2005. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 191–218.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.112904.151932>
- Helrich, K., 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, fifteenth ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, Virginia. USA.
- Herrera-Peraza, R.A., Hamel, C., Fernández, F., Ferrer, R.L., Furrázola, E., 2011. Soil–strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants? *Mycorrhiza* 21, 183–193.
<https://doi.org/10.1007/s00572-010-0322-6>
- Hewitt, E.J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition, 2a ed. Technical Communication No. 22. Commonwealth Agricultura Bureaux, Londo, UK.
- Hochholdinger, F., 2009. The maize root system: morphology, anatomy, and genetics, en: Bennetzen J.L., H.S.C. (Ed.), *Handbook of maize: its biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 145–160.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1_8
- IUSS Working Group WRB, 2014. World reference base for soil resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps, 2015a ed, World Soil Resources Reports No. 106. Rome, Italy. <https://doi.org/10.1017/S0014479706394902>
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., Barea, J.-M., 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. soils* 37, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0546-5>
- Ji, B., Gehring, C.A., Wilson, G.W.T., Miller, R.M., Flores-Rentería, L., Johnson, N.C., 2013. Patterns of diversity and adaptation in Glomeromycota from three prairie grasslands. *Mol. Ecol.* 22, 2573–2587.
<https://doi.org/10.1111/mec.12268>
- Johnson, N.C., Graham, J.H., 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant Soil.* <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1406-1>
- Johnson, N.C., Graham, J.H., Smith, F.A., 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.* 135, 575–585. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00729.x>
- Johnson, N.C., Hoeksema, J.D., Bever, J.D., Chaudhary, V.B., Gehring, C., Klironomos, J.N., Koide, R.T., Miller, R.M., Moore, J., Moutoglis, P., Schwartz, M., Simard, S., Swenson, W., Umbanhowar, J., Wilson, G., Zabinski, C., 2006. From lilliput to brobdingnag: extending models of mycorrhizal function across scales. *Bioscience* 56, 889–900. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)56\[889:FLTBEM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)56[889:FLTBEM]2.0.CO;2)
- Johnson, N.C., Wilson, G.W.T., Bowker, M.A., Miller, R.M., 2010. Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2093–8.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906710107>
- Johnson, N.C., Wilson, G.W.T., Wilson, J.A., Miller, R.M., Bowker, M.A., 2015. Mycorrhizal phenotypes and the law of the minimum. *New Phytol.* 205, 1473–1484. <https://doi.org/10.1111/nph.13172>
- Jones, D.L., Magthab, E.A., Gleeson, D.B., Hill, P.W., Sánchez-Rodríguez, A.R., Roberts, P., Ge, T., Murphy, D.V., 2018. Microbial competition for nitrogen and carbon is as intense in the subsoil as in the topsoil. *Soil Biol. Biochem.* 117, 72–82. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2017.10.024>
- Jones, P.G., Thornton, P.K., 2003. The potential impacts of climate change on maize production in Africa and Latin America in 2055. *Glob. Environ. Chang.* 13, 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0959-3780\(02\)00090-0](https://doi.org/10.1016/S0959-3780(02)00090-0)
- Klironomos, J.N., 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84, 2292–2301. <https://doi.org/10.1890/02-0413>
- Kogel, K.H., Franken, P., Hückelhoven, R., 2006. Endophyte or parasite - what decides? *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.001>
- Lambert, D.H., Cole, H., Baker, D.E., 1980. Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytol.* 85, 513–520. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb00766.x>
- Larsen, J., Jaramillo-Lopez, P., Najera-Rincon, M., Gonzalez-Esquivel, C.E., 2015. Biotic interactions in the

- rhizosphere in relation to plant and soil nutrient dynamics. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15, 449–463. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000039>
- Larsen, J., Nájera-Rincon, M., Esquivel, C., Gavito, M., 2014. Management of rhizosphere microorganisms in relation to plant nutrition and health, en: *Agroecology, Ecosystems, and Sustainability*. Informa UK. <https://doi.org/103-120>. doi:10.1201/b17775-6
- Larsen, J., Thingstrup, I., Jakobsen, I., Rosendahl, S., 1996. Benomyl inhibits phosphorus transport but not fungal alkaline phosphatase activity in a *Glomus*-cucumber symbiosis. *New Phytol.* 132, 127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04518.x>
- Lehmann, A., Stahr, K., 2010. The potential of soil functions and planner-oriented soil evaluation to achieve sustainable land use. *J. Soils Sediments* 10, 1092–1102. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0207-5>
- Lehmann, D., Stahr, K., 2008. TUSEC-Technique for soil evaluation and categorization for natural and anthropogenic soils. Germany: Universitat Hohenheim Bodenkundliche Hefte.
- Lekberg, Y., Helgason, T., 2018. In situ mycorrhizal function - knowledge gaps and future directions. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.15064>
- Liu, Y., Villalba, G., Ayres, R.U., Schroder, H., 2008. Global phosphorus flows and environmental impacts from a consumption perspective. *J. Ind. Ecol.* 12, 229–247. <https://doi.org/10.1111/j.1530-9290.2008.00025.x>
- López-Carmona, D.A., Alarcón, A., Martínez-Romero, E., Peña-Cabriales, J.J., Larsen, J., 2019. Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios. *Rhizosphere* 9, 38–46. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2018.11.004>
- Lynch, J.M., de Leij, F., 2012. *Rhizosphere*, eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000403.pub2>
- Ma, M., Ongena, M., Wang, Q., Guan, D., Cao, F., Jiang, X., Li, J., 2018. Chronic fertilization of 37 years alters the phylogenetic structure of soil arbuscular mycorrhizal fungi in Chinese Mollisols. *AMB Express* 8, 57. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0587-2>
- Martín-Robles, N., Lehmann, A., Seco, E., Aroca, R., Rillig, M.C., Milla, R., 2018. Impacts of domestication on the arbuscular mycorrhizal symbiosis of 27 crop species. *New Phytol.* 218, 322–334. <https://doi.org/10.1111/nph.14962>
- Min, H., Chen, C., Wei, S., Shang, X., Sun, M., Xia, R., Liu, X., Hao, D., Chen, H., Xie, Q., 2016. Identification of drought tolerant mechanisms in maize seedlings based on transcriptome analysis of recombination inbred lines. *Front. Plant Sci.* 7, 1080. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01080>
- Minotti, G., Aust, S., 1987. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 262, 1098–1104.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Miyauchi, M.Y.H., Lima, D.S., Nogueira, M.A., Lovato, G.M., Murate, L.S., Cruz, M.F., Ferreira, J.M., Zangaro, W., Andrade, G., 2008. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. *Sci. Agric.* 65, 525–531. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000500012>
- Morgan, J.A.W., Bending, G.D., White, P.J., 2005. Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1729–1739. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri205>
- Morgan, J.M., 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 299–319. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001503>
- Munkvold, L., Kjøller, R., Vestberg, M., Rosendahl, S., Jakobsen, I., 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 164, 357–364. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x>
- Murray-Tortarolo, G.N., Jaramillo, V.J., Larsen, J., 2018. Food security and climate change: the case of rainfed maize production in Mexico. *Agric. For. Meteorol.* 253–254, 124–131. <https://doi.org/10.1016/J.AGRFORMET.2018.02.011>
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K., Alves da Silva, G., 2011. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2, 191–199. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2011.02.02.10>
- Ortas, I., Akpınar, Ç., 2011. Response of maize genotypes to several mycorrhizal inoculums in terms of plant growth, nutrient uptake and spore production. *J. Plant Nutr.* 34, 970–987. <https://doi.org/10.1080/01904167.2011.555580>
- Ortega-Paczka, R., 2003. La diversidad del maíz en México, en: Esteva, G., Marielle, C. (Eds.), *Sin maíz no hay país*. CONACULTA, México D.F., pp. 123–154.
- Osman, K.T., 2013. *Soils principles, properties and management*, 1a ed. Springer Netherlands, Dordrecht.

- https://doi.org/10.1007/978-94-007-5663-2_1
- Oxborough, K., Baker, N.R., 1997. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv/Fm- without measuring Fo'. *Photosynth. Res.* 54, 135–142. <https://doi.org/10.1023/A:1005936823310>
- Pánková, H., Münzbergová, Z., Rydlová, J., Vosátka, M., 2014. Co-adaptation of plants and communities of arbuscular mycorrhizal fungi to their soil conditions. *Folia Geobot.* 49, 521–540. <https://doi.org/10.1007/s12224-013-9183-z>
- Pedersen, C.T., Sylvia, D.M., 1997. Limitations to using benomyl in evaluating mycorrhizal functioning. *Biol. Fertil. Soils* 25, 163–168. <https://doi.org/10.1007/s003740050298>
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158–160. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Pingali, P.L., 2012. Green Revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* 109, 12302–12308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912953109>
- Quiroga, G., Erice, G., Aroca, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J.M., 2017. Enhanced drought stress tolerance by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in a drought-sensitive maize cultivar is related to a broader and differential regulation of host plant aquaporins than in a drought-tolerant cultivar. *Front. Plant Sci.* 8, 1056. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01056>
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1312, 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
- Roesti, D., Gaur, R., Johri, B., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K., Aragano, M., 2006. Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1111–1120. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.09.010>
- Romaní, A.M., Fischer, H., Mille-Lindblom, C., Tranvik, L.J., 2006. Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology* 87, 2559–2569. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2559:IOBAFO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2559:IOBAFO]2.0.CO;2)
- Rosner, K., Bodner, G., Hage-Ahmed, K., Steinkellner, S., 2018. Long-term soil tillage and cover cropping affected arbuscular mycorrhizal fungi, nutrient concentrations, and yield in sunflower. *Agron. J.* 110, 2664–2672. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.03.0177>
- Rúa, M.A., Antoninka, A., Antunes, P.M., Chaudhary, V.B., Gehring, C., Lamit, L.J., Piculell, B.J., Bever, J.D., Zabinski, C., Meadow, J.F., Lajeunesse, M.J., Milligan, B.G., Karst, J., Hoeksema, J.D., 2016. Home-field advantage? evidence of local adaptation among plants, soil, and arbuscular mycorrhizal fungi through meta-analysis. *BMC Evol. Biol.* 16, 122. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0698-9>
- Ruiz-Lozano, J., Porcel, R., Bárzana, G., Azcón, R., Aroca, R., 2012. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant drought tolerance: state of the art, en: Aroca R (Ed.), *Plant responses to drought stress*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 335–362. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_13
- Ruiz-Lozano, J.M., 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. *New perspectives for molecular studies. Mycorrhiza* 13, 309–317. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0237-6>
- Ryan, M.H., Graham, J.H., 2018. Little evidence that farmers should consider abundance or diversity of arbuscular mycorrhizal fungi when managing crops. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.15308>
- Sámano-Rentería, M., 2013. La agroecología como una alternativa de seguridad alimentaria para las comunidades indígenas. *Rev. Mex. ciencias agrícolas* 4, 1251–1266.
- Sanchez, G.J., Goodman, M.M., Stuber, C.W., 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Econ. Bot.* 54, 43–59. <https://doi.org/10.1007/BF02866599>
- Sangabriel-Conde, W., Negrete-Yankelevich, S., Maldonado-Mendoza, I.E., Trejo-Aguilar, D., 2014. Native maize landraces from Los Tuxtlas, Mexico show varying mycorrhizal dependency for P uptake. *Biol. Fertil. Soils* 50, 405–414. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0847-x>
- Sarabia, M., Cornejo, P., Azcón, R., Carreón-Abud, Y., Larsen, J., 2017. Mineral phosphorus fertilization modulates interactions between maize, rhizosphere yeasts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Rhizosphere* 4, 89–93. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2017.09.001>
- Sawers, R.J.H., Svane, S.F., Quan, C., Grönlund, M., Wozniak, B., Gebreselassie, M.N., González-Muñoz, E., Chávez Montes, R.A., Baxter, I., Goudet, J., Jakobsen, I., Paszkowski, U., 2017. Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external

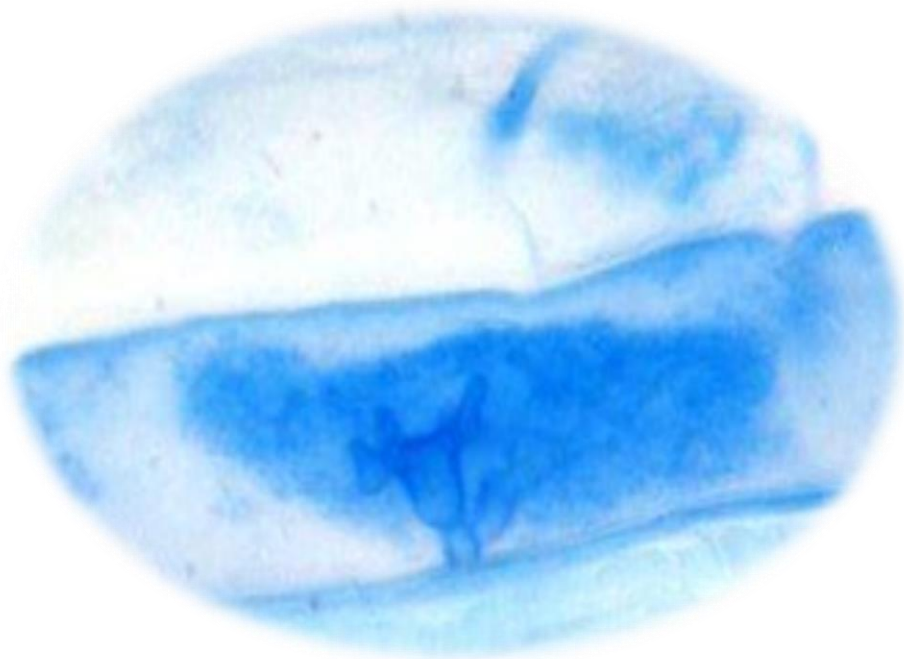
- hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters. *New Phytol.* 214, 632–643. <https://doi.org/10.1111/nph.14403>
- Schmidhuber, J., Tubiello, F.N., 2007. Global food security under climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19703–19708. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701976104>
- Shiva, V., 2016. *The violence of the green revolution : third world agriculture, ecology and politics*, 1a ed. University Press of Kentucky.
- Smith, I.K., 1985. Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.* 79, 1044–7. <https://doi.org/10.1104/PP.79.4.1044>
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd ed. Academic Press.
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Stoate, C., Báldi, A., Beja, P., Boatman, N.D., Herzon, I., van Doorn, A., de Snoo, G.R., Rakosy, L., Ramwell, C., 2009. Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe - A review. *J. Environ. Manage.* <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.07.005>
- Svenningsson, N.B., Stephanie, •, Watts-Williams, J., Joner, E.J., Battini, F., Aikaterini Efthymiou, •, Cruz-Paredes, C., Nybroe, O., Jakobsen, • Iver, 2018. Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. *ISME J.* 12, 1296–1307. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0059-3>
- Tallaksen, J., Bauer, F., Hulteberg, C., Reese, M., Ahlgren, S., 2015. Nitrogen fertilizers manufactured using wind power: greenhouse gas and energy balance of community-scale ammonia production. *J. Clean. Prod.* 107, 626–635. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2015.05.130>
- Thomson, B.D., Robson, A.D., Abbott, L.K., 1992. The effect of long-term applications of phosphorus fertilizer on populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pastures. *Aust. J. Agric. Res.* 43, 1131–1142. <https://doi.org/10.1071/AR9921131>
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677. <https://doi.org/10.1038/nature01014>
- Torstensson, L., Wessén, B., 1984. Interactions between the fungicide benomyl and soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 16, 445–452. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(84)90050-6)
- Treseder, K.K., Allen, M.F., 2002. Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: A model and field test. *New Phytol.* 155, 507–515. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00470.x>
- Turrini, A., Avio, L., Giovannetti, M., Agnolucci, M., 2018. Functional complementarity of arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota: The challenge of translational research. *Front. Plant Sci.* 9, 1407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01407>
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., Shinozaki, K., 2010. “Omics” analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.006>
- Vörösmarty, C.J., Green, P., Salisbury, J., Lammers, R.B., 2000. Global water resources: vulnerability from climate change and population growth. *Science* (80-.). 289, 284–288. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.289.5477.284>
- Welc, M., Ravnskov, S., Kieliszewska-Rokicka, B., Larsen, J., 2010. Suppression of other soil microorganisms by mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in root-free soil. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1534–1540. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2010.05.024>
- Williams, A., Manoharan, L., Rosenstock, N.P., Olsson, P.A., Hedlund, K., 2017. Long-term agricultural fertilization alters arbuscular mycorrhizal fungal community composition and barley (*Hordeum vulgare*) mycorrhizal carbon and phosphorus exchange. *New Phytol.* 213, 874–885. <https://doi.org/10.1111/nph.14196>
- Xin-Xin, W., Xiaojing, W., Yu, S., Yang, C., Shitong, L., Xinping, C., Gu, F., Kuyper, T.W., 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi negatively affect nitrogen acquisition and grain yield of maize in a N deficient soil. *Front. Microbiol.* 9, 418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00418>
- Yang, H., Schroeder-Moreno, M., Giri, B., Hu, S., 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi and their responses to nutrient enrichment, en: Giril, B., Prasad, R., Varma, A. (Eds.), *Root Biology*. Springer, Cham, pp. 429–449. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_17
- Zhang, X., Wang, L., Ma, F., Yang, J., Su, M., 2016. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on carbon and nitrogen distribution and grain yield and nutritional quality in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Sci. Food Agric.* 97, 2919–2925. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8129>
- Zhu, C., Ling, N., Guo, J., Wang, M., Guo, S., Shen, Q., 2016. Impacts of fertilization regimes on arbuscular mycorrhizal fungal (amf) community composition were correlated with organic matter composition in

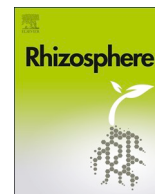
maize rhizosphere soil. *Front. Microbiol.* 7, 1840. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01840>
Zitlalpopoca-Hernandez, G., Najera-Rincon, M.B., Del-Val, E., Alarcon, A., Jackson, T., Larsen, J., 2017.
Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and
the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Soil Ecol.* 115, 38–43.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.014>

CAPÍTULO II

Chapter 2. Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios

Capítulo publicado: López-Carmona, D.A., Alarcón, A., Martínez-Romero, E., Peña-Cabriales, J.J., Larsen, J., 2019. *Rhizosphere* 9, 38–46.
<https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2018.11.004>





Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios



Dante A. López-Carmona^a, Alejandro Alarcón^b, Esperanza Martínez-Romero^c,
Juan José Peña-Cabriaes^d, John Larsen^{a,*}

^a Instituto de investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta, 58190 Morelia, Michoacan, Mexico

^b Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, 56230 Texcoco, Estado de Mexico, Mexico

^c Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

^d Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV, Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, 36821 Irapuato, Guanajuato, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Agroecology

Maize

Mineral fertilization

Rhizosphere

Plant growth promoting microorganisms

ABSTRACT

With the objective to examine maize plant response to whole rhizosphere microbial communities in terms of growth and nutrition, we performed a greenhouse pot experiment with full mineral fertilization except for N and P, which were applied in a fully factorial set-up (Without, with N, with P and with N + P). Rhizosphere microbial communities were measured in terms of mycorrhiza formation and biomarker fatty acids. Whole rhizosphere microbial communities promoted plant growth with single N fertilization (P limitation), whereas negative plant growth responses were observed without fertilization (N and P limitation), single P fertilization (N limitation) and dual N and P fertilization (no nutrient limitation). Whole rhizosphere microbial communities increased and decreased shoot N content without and with N fertilization, respectively. On the other hand whole rhizosphere microbial communities increased shoot P content both with and without P fertilization, though more without P. The observed plant growth and shoot nutrient response to whole rhizosphere microbial communities seems to be linked to the root association with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and abundance of rhizosphere microorganisms. In conclusion, our results show that maize plant response to whole rhizosphere microbial communities in terms of growth and nutrition is strongly associated with N and P fertilization balance.

1. Introduction

Plant roots naturally associate with plant growth promoting microorganisms, such as AMF and rhizobacteria (Philippot et al., 2013). Conservation and management of these rhizosphere microorganisms has been suggested key to increase crop N and P use efficiency (Drinkwater and Snapp, 2007; Richardson et al., 2009).

Among plant growth promoting microorganisms AMF are important for crop nutrition connecting the root with the soil phase via the formation of an extensive mycelial network providing valuable mineral nutrients especially the less mobile ones like P (Smith and Smith, 2011). Regarding N nutrition rhizobacteria are of special importance since they can acquire N from the atmosphere (Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero, 2001).

Most studies on plant growth promoting microorganisms focus on single species (Dobbelaere et al., 2002; Harman et al., 2004; Leggett et al., 2015; Sarabia et al., 2018) or consortia with microorganisms

from different functional groups (Vázquez et al., 2000; Berta et al., 2013; Larsen et al., 2017), whereas information on plant growth response to whole rhizosphere microbial communities is limited, which is a major constraint for successful integration of these plant beneficial microorganisms in agroecosystems.

Maize is worldwide a basic crop for human consumption and animal fodder, which depends on high input of mineral fertilizers (Ranum et al., 2014). The maize root microbiome has received increasing interest to unravel its potential to improve maize growth and nutrition (Peiffer et al., 2013; Walters et al., 2018), but information on how agricultural practice affect the contribution of rhizosphere microorganisms on maize growth and nutrition is limited.

Agricultural practices such as crop rotation, tillage, pest management and fertilization are all essential components for crop production, which should be considered when conserving and managing native populations of plant growth promoting microorganisms in agroecosystems (Larsen et al., 2014). Especially application of mineral P fertilizers

* Corresponding author.

E-mail address: jlarsen@cieco.unam.mx (J. Larsen).

<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.11.004>

Received 12 November 2018; Accepted 12 November 2018

Available online 17 November 2018

2452-2198/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1

P values from analysis of variance of the main factors inoculum, N and P fertilization and their interactions for the variables shoot and root dry weight, shoot nutrients, response to rhizosphere microorganisms and AMF root colonization ($n = 4$).

	Dry weight		Shoot nutrients				Response to rhizosphere microorganisms			Root colonization
	Shoot	Root	N	P	Total P	Total N	Plant growth	Shoot P	Shoot N	AMF
Inoculum (I)	***	**	***	0.517	***	***	**	**	0.1809	0.4048
P	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**
N	***	***	***	***	***	***	***	***	0.5261	***
I × P	***	***	***	***	***	***	0.0784	***	***	***
I × N	*	0.8116	**	0.8971	*	**	0.3646	0.6832	0.2967	**
P × N	***	***	***	***	***	***	***	***	0.586	0.1022
I × P × N	***	*	*	*	**	**	0.1861	0.3084	0.1556	0.3364

* $p \leq 0.05$;

** $p < 0.01$;

*** $p < 0.001$.

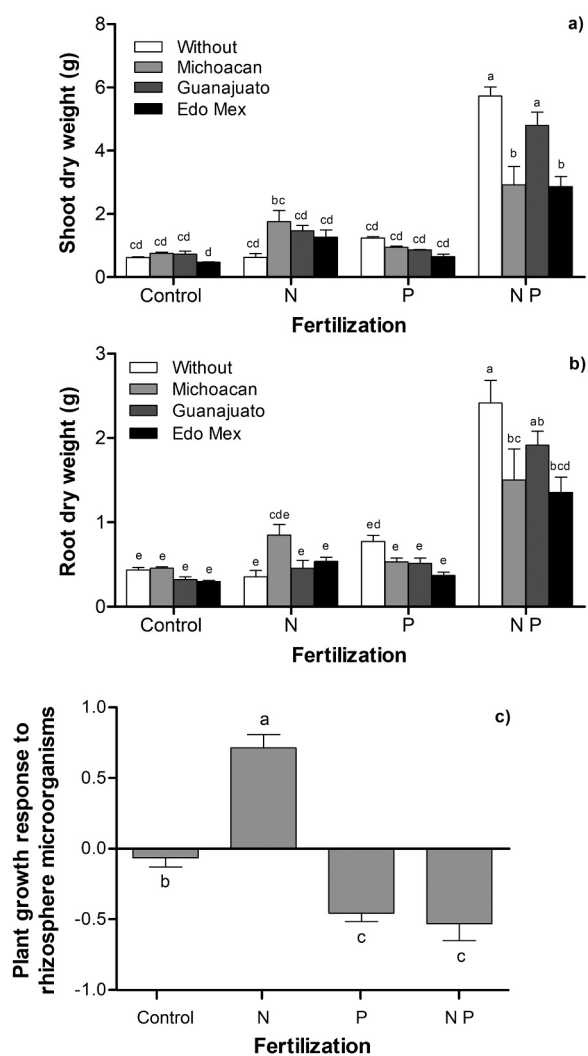


Fig. 1. Shoot (a) and root (b) dry weight and plant growth response to rhizosphere microorganisms (c) of eight-week-old maize plants without microbial inoculation or inoculation with whole rhizosphere microbial communities obtained from Michoacán, Guanajuato and Estado de México in combination with different mineral fertilization scenarios all with basic fertilization differing only in application of N and P: Without, with P, with N and with N and P). Values represent treatment means with standard error bars ($n = 4$). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).

can have negative effects on the functioning of mycorrhizal associations (Bhadalung et al., 2005; Treseder and Allen, 2002) and may result in plant growth suppression, when the cost of maintaining the mycorrhizal symbiosis in terms of host photosynthates exceeds the benefits from improved AMF hyphal P uptake (Johnson and Graham, 2013).

Here we examined the contribution of three field populations of whole rhizosphere microbial communities on plant growth and N and P nutrition of maize plants subjected to four contrasting mineral fertilization settings all with full mineral fertilization other than N and P: 1) Control without N and P, 2) with N, 3) with P and 4) with N and P. We tested the hypothesis that plant growth and nutrient promotion by whole rhizosphere microbial communities will occur mainly under N or P limiting conditions.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

The experiment had a randomized three-factorial design: 1) Whole communities of rhizosphere microorganisms (Without and with inoculum from Michoacán, Guanajuato and Estado de México), 2) Nitrogen fertilization (Without and with) and 3) Phosphorus fertilization (Without and with). Each of the 16 treatments had 4 replicates resulting in a total of 64 experimental units.

2.2. Biological materials

Sampling of maize field rhizosphere soil was performed in November 2013 in the senescence plant growth phase in fields with rainfed maize in Michoacán, Guanajuato and Estado de México of conventional small holders. Geographic references and soil characteristics of the three fields are presented in Supplementary Table 1. In each field, an X sampling design was employed with the four extreme points and the center as the sampling points resulting in five samples. From each of the five sampling points complete $30 \times 30 \times 30$ cm blocks of soil were excavated with the plant stem as the centre and transferred to laboratory facilities for subsequent sample processing and analyses. Stones, large debris and macro fauna were removed from the soil, which thereafter was homogeneously mixed. A composite sample was made by mixing rhizosphere soil from all five blocks from each site.

Soil used for propagation of inoculum of rhizosphere microorganisms and in the main experiment was collected from the experimental field station of the Chapingo Autonomous University, Campus Morelia, Michoacán, Mexico ($19^{\circ}41'9.43''N$, $101^{\circ}14'18.34''W$). Soil texture was clayish (53.2% clay, 27.3% silt and 19.5% sand) and contained 2.7% organic matter, 23.2 mg kg^{-1} inorganic nitrogen, 5.8 mg kg^{-1} available

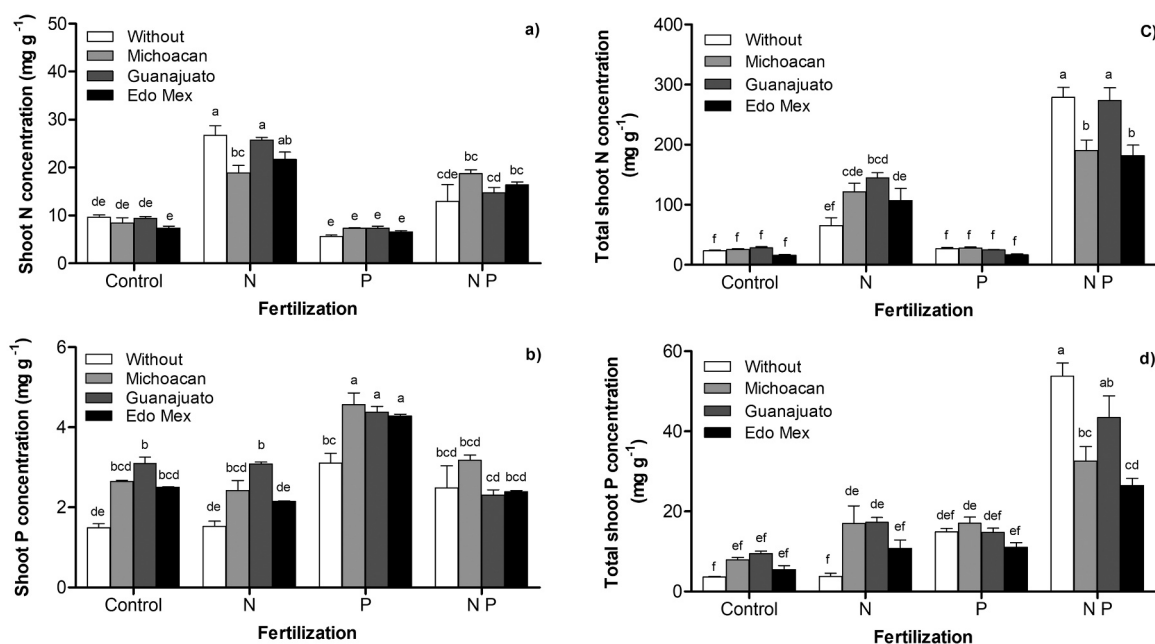


Fig. 2. Shoot N (a) and P (b) concentration and total shoot N (c) and P (d) content of eight-week-old maize plants without microbial inoculation or inoculation with whole rhizosphere microbial communities obtained from Michoacán, Guanajuato and Estado de México in combination with different mineral fertilization scenarios all with basic fertilization differing only in application of N and P: Without, with P, with N and with N and P). Values represent treatment means with standard error bars ($n = 4$). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).

phosphorus (Olsen P) and pH (H_2O) was 7.3. Soil was mixed with quartz sand (1:1, w:w) and disinfected in an autoclave (1 h, 120 °C).

Inoculum with communities of whole rhizosphere microorganisms was propagated using maize (*Zea mays* L, DK2041) as trap plants grown under greenhouse conditions. Maize seeds were sown in 3 L pots with 3 kg sterile soil:sand substrate (1:1, w/w) inoculated with maize field rhizosphere soil (10%) and without inoculation for the control treatment. Prior sowing all basic fertilizers except P were applied in the following amount ($mg\ kg^{-1}$): K_2SO_4 (105), $CaCl_2$ (105), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (2.94), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (7.56), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (14.7), $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.55), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (63), and $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$ (0.25). P fertilization was omitted in order to promote formation of the maize mycorrhiza association. N was applied as NH_4NO_3 corresponding to 50 mg N every second week starting two weeks after sowing and ending one week before harvesting resulting in a total of 200 mg N applied. Greenhouse temperature was approximately 15 °C at night and 25–30 °C during daytime. Plants were watered by weight on a daily basis to maintain 70% of the water holding capacity. Fifteen weeks after sowing when maize plants had reached the flowering stage plants and soil were left to dry for two weeks in the greenhouse. Roots were extracted from the dry soil, cut into 5–10 mm pieces and mixed carefully into the soil. This mix of substrate with root segments was used as inoculum of whole rhizosphere microbial communities. The AMF species in the inoculum were identified with spore morphology (Alvarado-Herrejón et al., 2018) (Supplementary Table 2).

2.3. Experimental set-up and conditions

Hybrid maize (DEKALB, 2042) was grown from seed in 1.5 l pots with 1.4 kg sterile soil:sand mix (1:1, w-w) similar to that used for trap cultures of field populations of whole rhizosphere microbial communities. Prior to sowing, mineral fertilizers were mixed into the soil-sand mix similar to the fertilization applied to the trap plants presented above according to the respective treatments with and without N and P. In treatments with P KH_2PO_4 was mixed into the soil prior sowing

corresponding to 100 mg P. N was added as NH_4NO_3 each week with 30 mg N per week starting two weeks after sowing until one week before harvest with a total of 180 mg N applied. Inoculum of rhizosphere microorganisms (10% of total pot soil-sand content) were mixed into the soil-sand mix prior sowing in accordance to their respective treatments. Plants were grown under greenhouse conditions for 8 weeks. Watering was performed on a daily basis to maintain 80% of the water holding capacity by weight. Greenhouse temperature was approximately 15 °C at night and 25–30 °C during daytime.

2.4. Harvest and analysis

Plants were harvested 8 weeks after sowing. From each pot the root system was removed and the soil without roots was stored at -20 °C until further processing. Roots were detached from shoots and washed and separately oven-dried at 80 °C for 48 h, and weighed.

All dried shoot tissue from each plant were ground and sieved with a mesh No 40 (0.425 mm) before acid digestion and subsequent N and P analyses. Initially, a mixed digester (1 g $CuSO_4$; 10 g K_2SO_4) was added to 0.25 g of shoot dry weight in a 75 mL glass tube. Then 3 mL of H_2O_2 (30% v/v) was added to carry out the oxidation reaction and finally, 7 mL of sulfuric acid (H_2SO_4) was added and left to react for 24 hours. Samples were then placed in a digester block to gradually increase the temperature (50 °C every 20 minutes) to 375 °C for 3 hours. The completely digested mixture was filtered (filter Whatman No 1, 125 mm) and measured by colorimetric reading at 660 nm in the autoanalyzer Braun + Luebbe III. N was measured with the semi-Kjeldahl method according to Bremner (1996) and P was measured according to Murphy and Riley (1962).

Prior drying, fresh roots was cut in 5–10 mm segments and mixed in water from which a two gram subsample was obtained for measurement of AMF root colonization. Root subsamples were cleared and stained according to Phillips and Hayman (1970) and examined for AMF root colonization using the line-intercept method as described by Giovannetti and Mosse (1980).

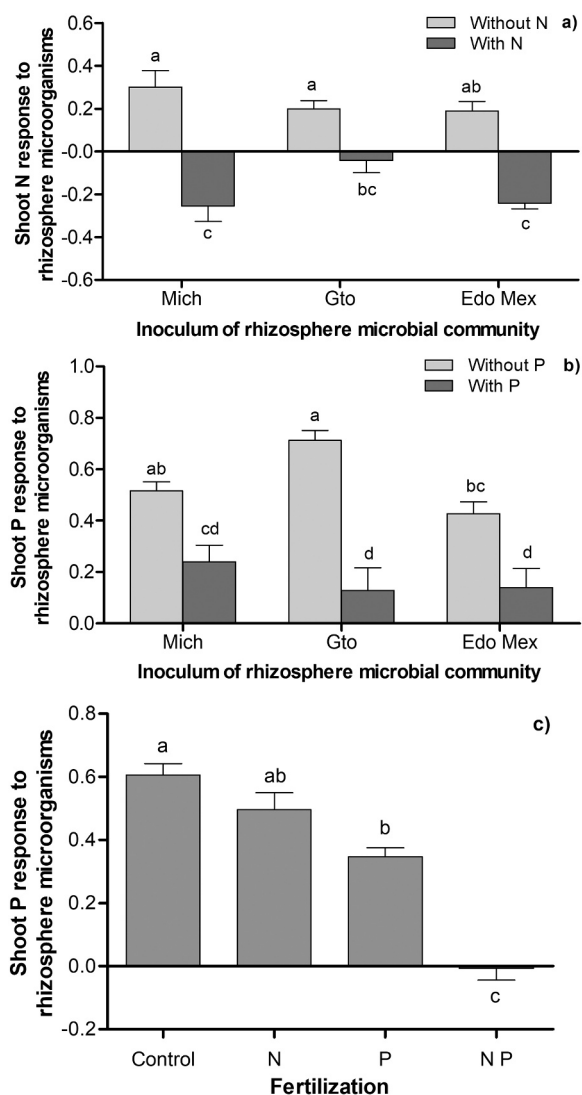


Fig. 3. Shoot N response to rhizosphere microorganisms of the factor treatment means of the Inoculum \times N interaction (a) and shoot P response to rhizosphere microorganisms of the factor treatment means of the interactions Inoculum \times P (b) and N \times P (c) of eight-week-old maize plants. Values represent treatment means with standard error bars (a, $n = 8$; b, $n = 8$; c, $n = 16$). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).

Ten gram of soil samples were freeze dried and powdered in a mortar, of which one-gram subsamples were used for extraction of whole cell fatty acids according to the method of Sasser (1990). To enable quantification of the extracted fatty acids, a known amount of an internal standard, nonadecanoate fatty acid methyl ester 19:0 was added to each sample. Analyses of fatty acid methyl esters were performed using the software package Sherlock Version 6.0 (MIDI Inc.). Hydroxylic (10:0 3OH, 12:0 2OH, 12:0 3OH, 16:0 2OH, 16:0 3OH, 18:0 2OH) and cyclic (17:0 cyclo) fatty acids were used as biomarkers for Gram negative (-) bacteria, fatty acids with branched chains localized on positions iso and anteiso (i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0) were used as Gram positive (+) bacteria biomarkers and the methylated fatty acid 17:0 10methyl was used a biomarker for Actinobacteria (Ratledge and Wilkinson, 1988). The fatty acid 16:1 ω 5 and 18:2 ω 6,9 were used as biomarkers for AMF (Olsson, 1999) and fungi (Frostegård and Bååth, 1996), respectively. Fatty acid analysis was performed with the Agilent gas chromatograph7890B.

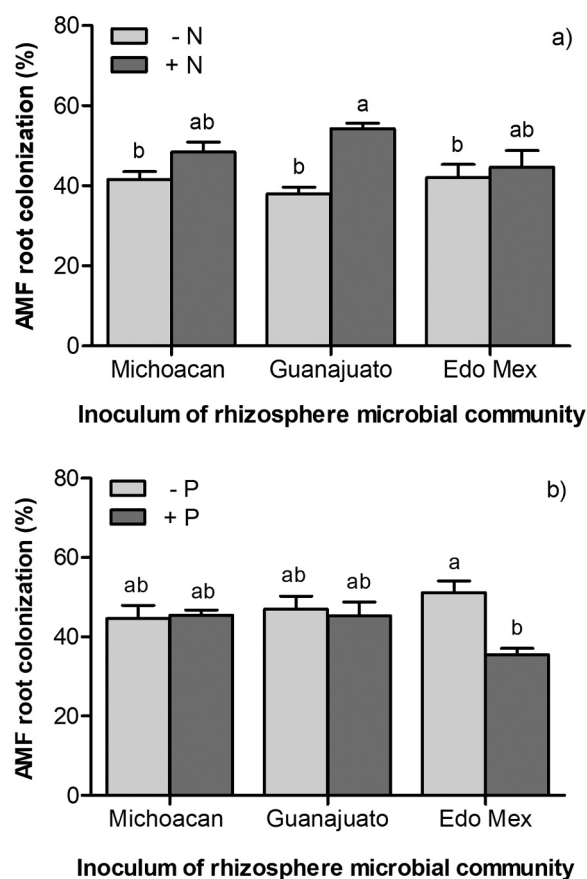


Fig. 4. AMF root colonization of the factor treatment means of Inoculum \times N (a) and Inoculum \times P (b) interactions of eight-week-old maize plants inoculated with whole rhizosphere microbial communities obtained from Michoacán, Guanajuato and Estado de México. Values represent treatment means with standard error bars (a, $n = 8$; b, $n = 8$). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).

2.5. Statistical analysis

Three way analyses of variance (ANOVA) were performed with the software StatGraphics Centurion XVII and graphs were produced with GraphPad Prism 5. Prior ANOVA variance homogeneity was verified with the Bartlett test. Comparisons between treatment means were performed with post hoc Tukey tests for significant factors and their interactions. Means of AMF root colonization were arcsine transformed prior ANOVA. Power analysis of the obtained statistical results was performed using the software Minitab (Supplementary Table 3).

3. Results

3.1. Shoot and root dry weight

Significant “Inoculum \times P \times N” interactions were obtained for shoot and root dry weight (Table 1). Combined N and P fertilization markedly increased shoot and root dry weight compared to that without fertilization and with single application of N or P (Fig. 1a,b). Inoculation with the whole rhizosphere microbial communities had no significant effects on shoot and root weight without fertilization and with single application of N or P (Fig. 1a,b). In combination with N and P fertilization the microbial inoculum Michoacán and Estado de Mexico caused marked shoot and root growth suppression, whereas no effect of

Table 2

P values from analysis of variance of the main factors inoculum, N and P fertilization and their interactions for the variables abundance of microbial biomarker fatty acids expressed per unit dry soil or root ($n = 4$).

Microorganisms	Inoculum (I)	P	N	I x P	I x N	P x N	I x P x N
nmole g⁻¹ dry soil							
Gram- bacteria	0.3296	0.3789	0.0925	*	0.7896	0.952	0.1565
Gram+ bacteria	0.9972	0.901	0.8413	0.2809	0.7748	0.7237	0.8648
Actinobacteria	*	0.1914	*	0.1129	0.6194	0.9724	0.4743
AMF	***	0.7086	0.8375	*	0.6185	0.7209	0.3917
Fungi	0.123	0.3865	0.4803	0.0714	0.7292	0.7456	0.1304
nmole g⁻¹ dry root							
Gram- bacteria	0.6587	0.2346	*	0.0933	0.7203	0.5995	0.1289
Gram+ bacteria	0.2909	***	*	0.2763	0.1332	0.5109	0.6524
Actinobacteria	0.1345	0.6118	0.3728	0.2529	0.8056	0.4853	0.6486
AMF	***	0.0575	**	0.9861	0.1141	0.2514	0.874
Fungi	0.703	0.1579	0.2579	0.6487	0.8033	0.9043	0.177

* $p \leq 0.05$;

** $p < 0.01$;

*** $p < 0.001$.

Guanajuato was observed (Fig. 1a,b).

In terms of total plant growth response to inoculation with whole rhizosphere microbial communities a significant “N x P” interaction was obtained (Table 1). Plant growth promotion was observed with single N fertilization, whereas plant growth suppression was observed without fertilization and with single P fertilization and combined N and P fertilization (Fig. 1c).

3.2. N and P shoot content

Significant “Inoculum x P x N” interactions were obtained for N and P shoot content both in terms of concentration and total amount (Table 1). N fertilization increased shoot N concentration, which however was reduced by inoculation with whole rhizosphere microbial community from Michoacán (Fig. 2a). Inoculation with whole rhizosphere microbial communities increased total shoot N content, but only in combination with single N fertilization (Fig. 2b). Plants fertilized with both N and P had the highest total shoot N content. However, inoculation with the whole rhizosphere microbial communities Michoacán and Guanajuato reduced the total shoot N content (Fig. 2b).

Shoot P concentration was highest with single P fertilization (Fig. 2c). Inoculation with the whole rhizosphere microbial community Guanajuato increased shoot P concentration without fertilization and with single N and P fertilization (Fig. 2c). The two other whole rhizosphere microbial communities Michoacán and Estado de Mexico increased shoot P concentration with single P fertilization (Fig. 2c). On the other hand, no effects of inoculation with the whole rhizosphere microbial communities were observed with combined N and P fertilization (Fig. 2c). Plants fertilized with both N and P had the highest total shoot P content, which however was reduced by inoculation with the whole rhizosphere microbial communities Michoacán and Estado de Mexico (Fig. 2d). In plants with single N fertilization, inoculation with the whole rhizosphere microbial communities Michoacán and Guanajuato increased total shoot P content (Fig. 2d).

A significant “Inoculum x N” interaction was observed for maize shoot N response to inoculation with whole rhizosphere microbial communities (Table 1), which for all communities were positive and negative, without and with N fertilization, respectively (Fig. 3a).

For maize shoot P response to inoculation with whole rhizosphere microbial communities significant “Inoculum x P” and “N x P” interactions were observed (Table 1). Positive shoot P response was observed for all three whole rhizosphere microbial communities both with and without P fertilization, but with stronger response without P fertilization (Fig. 3b). On the other hand combined N and P fertilization

resulted in a slight negative shoot P response to inoculation with whole rhizosphere microbial communities (Fig. 3c).

3.3. AMF root colonization

Significant “Inoculum x N” and “Inoculum x P” interactions were observed for AMF root colonization (Table 1). N fertilization increased AMF root colonization from the Guanajuato whole rhizosphere microbial community, but had no effect on the two other communities (Fig. 4a). P fertilization reduced AMF root colonization from the Estado de Mexico whole rhizosphere microbial community, but had no effect on the two other communities (Fig. 4b).

3.4. Abundance of rhizosphere microorganisms

A significant “Inoculum x P” interaction was observed for the abundance of Gram- bacteria (Table 2), however after the post-hoc ANOVA factor treatment means comparison no significant differences were observed. For the abundance of AMF a single Inoculum factor effect and an “Inoculum x P” interaction was observed (Table 2). In general the abundance of AMF was higher in treatments with inoculation of rhizosphere microorganisms (Fig. 5a). For Actinobacteria significant single factor effects of “Inoculum” and “N” were observed (Table 1), with higher abundance in inoculum from Michoacán (Fig. 5b) and in treatments with N fertilization (Fig. 5c).

For root specific abundance of rhizosphere microorganisms a significant effect of Inoculum was observed for the variable AMF (Table 2), where treatments with inoculation with rhizosphere microbial communities had higher values than the non-inoculated control (Fig. 6d). Significant single factor effects of “N” were observed for the root specific abundance of biomarker fatty acids Gram+ bacteria, Gram- bacteria and AMF (Table 2), which in all cases were reduced by N fertilization (Fig. 6a,c,e). Also a significant single factor “P” effect was observed for the root specific abundance of Gram+ bacteria (Table 1), where P fertilization reduced this variable (Fig. 6b).

3.5. Correlation analysis

From the correlation analysis linking plant and microbial parameters significant positive correlations were observed for AMF root colonization with shoot N concentration, total shoot N content and plant growth response to whole rhizosphere microbial communities (Table 3). Regarding abundance of rhizosphere microorganisms significant positive correlations were observed for Actinobacteria with

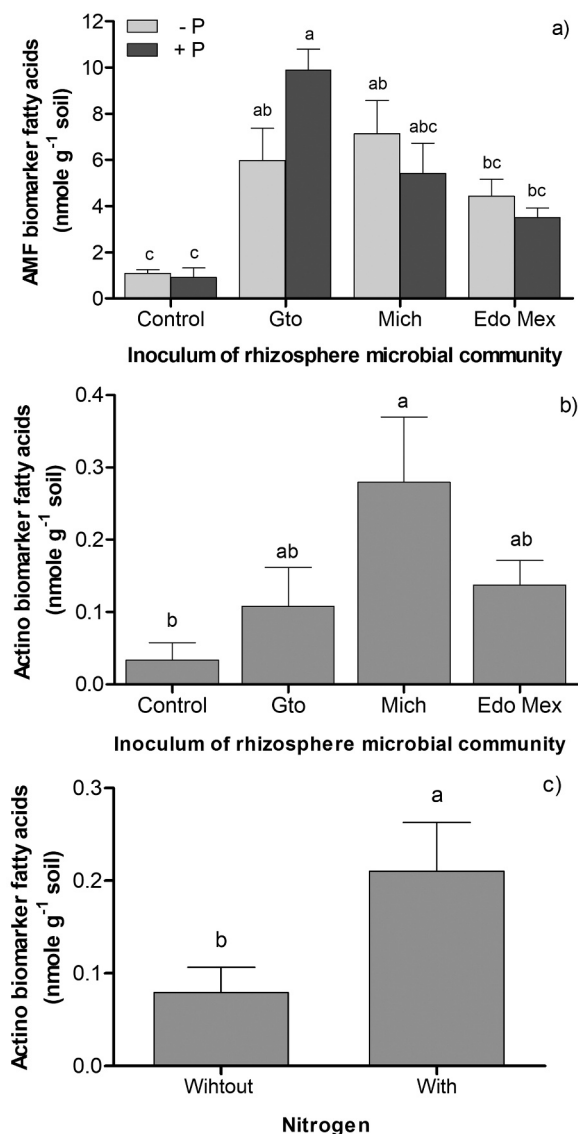


Fig. 5. Factor treatment means of the “Inoculum × P” interaction of the abundance of the AMF (nmole g⁻¹ soil) (a) and single factor effects of “Inoculum” (b) and N (c) of the abundance of Actinobacteria (nmole g⁻¹ soil) of eight-week-old maize plants. Values represent treatment means with standard error bars (a, n = 8; b, n = 16; c, n = 32). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).

shoot N concentration and shoot N response to whole rhizosphere microbial communities (Table 3).

Multiple correlations were observed between root specific abundance of rhizosphere microorganisms and plant parameters (Table 3). For shoot dry weight only negative correlation was observed with specific abundance of Gram+ bacteria, whereas for root dry weight root specific abundance of all microbial groups except Actinobacteria correlated negatively (Table 3). Abundance of root specific Actinobacteria correlated positively with shoot N concentration and shoot N response to rhizosphere microorganisms, but correlated negatively with plant growth response to rhizosphere microorganisms (Table 3). Abundance of root specific abundance of Gram+ bacteria correlated negatively with total shoot P and N (Table 3). For shoot P response to rhizosphere microorganisms positive correlations were observed with all root specific abundance of all groups of microorganisms except Actinobacteria (Table 3).

3.6. Statistical power analysis

In general the power analysis for all three factors of the ANOVA revealed high statistical power (> 80%) for all plant variables, whereas lower statistical power was obtained for the abundance of rhizosphere microorganisms (Supplementary material Table 3). In most cases significant effects coincided with high statistical power.

4. Discussion

Here we show that mineral N and P fertilization strongly affect the contribution of whole rhizosphere microbial communities to maize growth and nutrition. Our hypothesis that maize plant growth promotion and nutrition by whole rhizosphere microbial communities is higher under N and P nutrient limitations was only partially confirmed. Instead our results show that maize plant growth and nutrient response to whole rhizosphere microbial communities depends on the balance between N and P fertilization and that N limitation result in plant growth suppression.

The observed effects of whole rhizosphere microbial communities on maize plant growth seem to be ascribed mainly to AMF and Actinobacteria as indicated from the positive and negative correlation with maize plant growth response, respectively. Plant growth promotion was obtained only in P limited soil without N limitation, which is a common response of maize to inoculation with single species (Sawers et al., 2017) and field populations (Sarabia et al., 2017; Zitlalpopoca-Hernandez et al., 2017) of AMF. On the contrary rhizosphere microorganisms caused plant growth suppression when maize plants were grown under N limited conditions. Similar results were reported by Johnson et al. (2015) showing that AMF field populations can ameliorate P limitation, but not N limitation in the grass *Andropogon gerardii*. Indeed it is well established that AMF can promote P nutrition of their host and to a limited extend also N nutrition (Smith and Smith, 2011).

Two out of the three rhizosphere microbial communities caused strong plant growth suppression in maize when grown in soil without nutrient limitations, which is most likely the result of a parasitic maize-AMF association, where the cost of hosting the AMF in terms of photosynthates was higher than the benefit in terms of P acquisition. Similar results were reported by Sarabia et al. (2017) showing that a field population of AMF caused strong plant growth suppression in maize grown in soil with mineral P fertilization. Plant growth depression is a common mycorrhizal phenotype mainly caused by low light intensity and high P fertilization (Johnson and Graham, 2013). However, from the observed negative correlation between abundance of Actinobacteria and plant growth response to whole rhizosphere microbial communities, it is important to further address the role of Actinobacteria in plant growth suppressions, which may not only be a question of carbon drain.

Our results showing that the percentage of AMF root colonization correlated positively with both shoot N concentration and total shoot N content, underlines the importance of AMF in plant and soil N dynamics, which however is an area of AMF research with a substantial knowledge gap (Larsen et al., 2015).

Mineral phosphorus fertilization is known to decrease root colonization of field populations of AMF (Sarabia et al., 2017; Toljander et al., 2008; Johnson et al., 2006; Thomson et al., 1992), which in the present study was only observed for the rhizosphere microbial community from Estado de Mexico. On the contrary AMF root colonization with the rhizosphere microbial community from Guanajuato was increased by N fertilization. Similar findings were reported by Aguilar et al. (2017) showing that NPK fertilization increased AMF root colonization of native field populations of AMF. No clear response pattern of AMF root colonization to mineral fertilization scenarios can be obtained from the

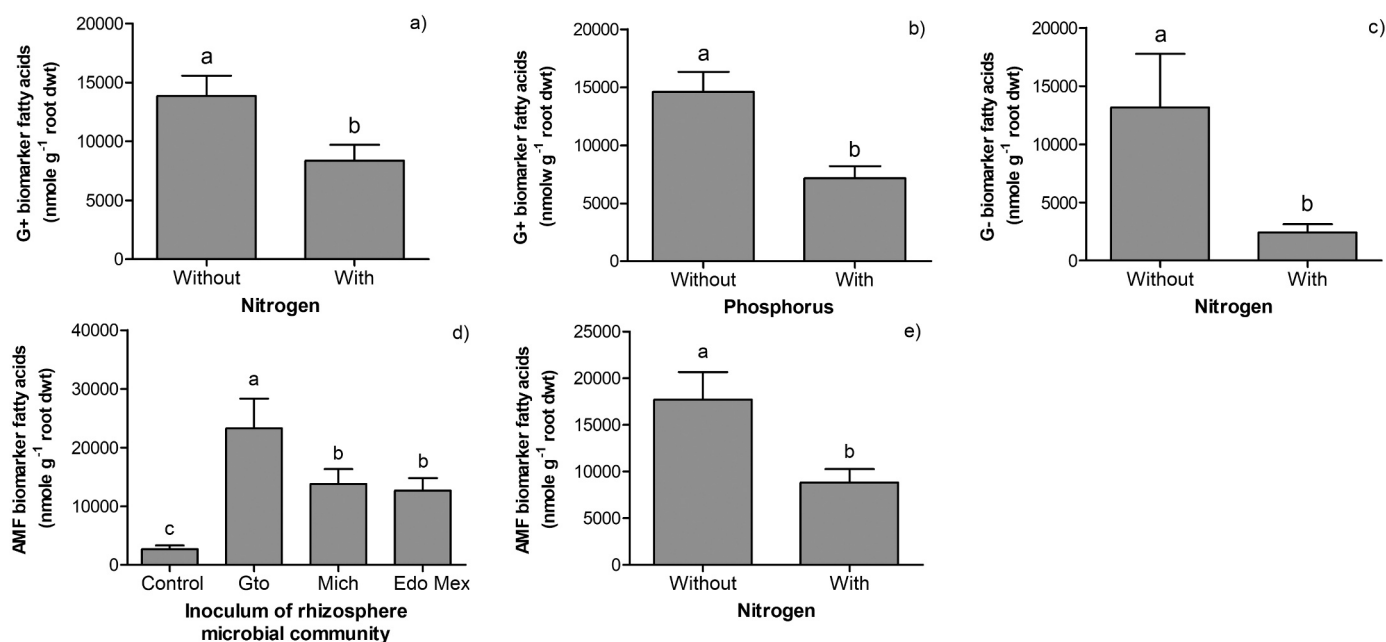


Fig. 6. Factor treatment means of single factor effects of N on the root specific abundance (nmole g⁻¹ root) of Gram+ bacteria (a), Gram- bacteria (c) and AMF (e), single factor effect of P on the root specific abundance of Gram- bacteria (b) and single factor effect of Inoculum on the root specific abundance of AMF (d) of eight-week-old maize plants. Values represent treatment means with standard error bars (a, n = 32; b, n = 32; c, n = 32; d, n = 16; e, n = 32). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA Tukey test ($p \leq 0.05$).

present study, but our results suggest a possible adaptation of field populations of AMF to agricultural practice such as mineral fertilization in the environment of their origin. Interestingly, the AMF in the rhizosphere microbial community from Estado de Mexico and Guanajuato have been exposed to high and low input of mineral fertilizer inputs, respectively, which may have resulted in some level of environmental adaptation of the native AMF. However, this needs to be further addressed with an experimental design exploring this question in particular.

This evident strong complexity of AMF response to mineral N and P fertilization was further underlined with the observed limited effects on AMF soil colonization as measured in terms of the abundance of the AMF biomarker fatty acid 16:1 ω 5. On the contrary, other studies have reported reduction in AMF soil colonization both from native AMF communities (Gryndler et al. 2006) and single species (Olsson et al. 1995).

Plant growth and nutrient promotion from root associated bacteria including *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Bacillus*, which are common and abundant inhabitants of the rhizosphere microbiome, have been well studied (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006; Dobbelaere et al., 2003). In the present study, whole rhizosphere microbial communities could not ameliorate maize N deficiency in terms of plant growth confirming the general consensus that N fixation from non-symbiotic diazotrophic bacteria in agroecosystems is limited (Hodge and Storer, 2014; Herridge et al., 2008).

Overall our results suggest a positive contribution of whole rhizosphere microbial communities for maize shoot P independent of N fertilization though higher without P fertilization. Indeed the plant P uptake from the mycorrhiza pathway has been shown to be important independent of mycorrhiza plant growth response and P soil availability (Smith et al., 2003). On the other hand, our results also suggest that the abundance of Actinobacteria in the rhizosphere soil and as well as root specific abundance associate with maize shoot N content and shoot N response to whole rhizosphere microbial communities, which indicate that Actinobacteria are involved in maize N nutrition.

The observed positive correlation between shoot P response and root specific abundance of all groups of rhizosphere microorganisms

except Actinobacteria, underlines the importance of rhizosphere microorganisms assisted plant P uptake, which is in accordance to Richardson et al. (2011). On the other hand, in terms of root specific abundance only Actinobacteria correlated positively with shoot N response, which suggest that for maize N nutrition the rhizosphere assisted N uptake is of less importance. Also it is important to note that the root specific abundance of Actinobacteria correlated negatively with plant growth response to whole rhizosphere microbial communities, which may have resulted in increased shoot N concentration.

On the other hand the contribution of whole rhizosphere microbial communities for maize shoot N content was positive and negative without and with N fertilization respectively, suggesting competition between roots and rhizosphere microorganisms for N, when N is limited for plant growth, which is in accordance with Kuzyakov and Xu (2013).

In general effects of N and P fertilization on the abundance of rhizosphere microorganisms were limited when expressed per g soil, but when expressed per gram root dry weight in terms of root specific abundance N fertilization reduced the amount of Gram- and Gram+ bacteria as well as AMF, whereas P fertilization only reduced the amount of Gram+ bacteria. These findings are in accordance with (Carvalhais et al. 2011) showing that N and P fertilization alter the composition and reduce the amount of root exudates and consequently the abundance and community composition of microorganisms thriving from these exudates.

Plant growth and nutrition promoting by rhizosphere microorganism, including AMF and rhizobacteria, offer several key ecosystem services in agroecosystems in relation to plant and soil nutrient dynamics (Larsen et al., 2015), which should be conserved and managed as a central component to improve nutrient use efficiency (Richardson et al., 2009) and soil fertility management (Drinkwater and Snapp, 2007). Here we show that mineral N and P fertilization strongly associate with the contribution of whole rhizosphere microbial communities in maize growth and nutrition. However, response of rhizosphere microorganism to other agricultural practices such as crop genotype, crop rotation, tillage, crop protection measures and organic fertilization should be further addressed to fully explore the benefits of rhizosphere microorganisms in agroecosystems (Larsen et al., 2014).

Table 3 Pearson correlation analysis between plant and microbial variables measured at harvest of eight-week-old maize plants with all 64 experimental units.

	Shoot dry weight		Root dry weight		Shoot P concentration		Shoot N concentration		Total shoot P		Total shoot N		Plant growth response		Shoot P response		Shoot N response	
	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r
AMF root colonization	0.2767	0.2368	0.5484	0.1319	0.089	-0.3626	0.5636	0.1981	0.3648	0.1981	0.4172	0.4504	0.6908	0.0877	0.3641	-0.1984		
Abundance of rhizosphere microorganisms (nmole g ⁻¹ dry soil)																		
Gram-	0.1707	-0.2957	0.123	-0.3309	0.9494	-0.014	0.1327	-0.323	0.1539	-0.3072	0.1232	-0.3308	0.0677	0.3875	0.0886	-0.3631		
Gram+	0.6504	-0.0998	0.4873	-0.1525	0.3509	-0.2038	0.8839	0.0322	0.5166	-0.1425	0.7331	-0.0752	-0.0672	0.5875	0.4368	-0.1704		
Actinobacteria	0.2448	0.2526	0.3327	0.2115	0.2843	-0.2332	0.481	0.1207	0.1207	-0.3328	0.0946	0.3569	-0.3389	0.1008	0.4256			
AMF	0.2459	0.2521	0.3963	0.1857	0.4071	-0.1815	0.286	0.3293	0.3293	0.2129	0.1716	0.2951	0.2573	0.9401	0.5498	-0.1315		
Fungi	0.3169	-0.2183	0.2145	-0.269	0.9559	0.0122	0.2627	-0.2436	0.3215	-0.2163	0.2739	-0.2381	-0.0407	0.0864	0.2489	-0.2505		
Root specific abundance of rhizosphere microorganisms (nmole g ⁻¹ dry root)																		
Gram-	0.0736	-0.3802	-0.4233	0.9472	0.0146	0.0146	0.1422	-0.3158	0.0593	-0.3989	0.0612	-0.3963	-0.0738	0.4694	0.072	-0.3821		
Gram+	0.5241	**	-0.5926	0.8546	0.0405	0.0405	0.4314	-0.1725	-0.5491	-0.5491	-0.4886	0.6159	-0.1104	0.5378	0.1832	-0.2877		
Actinobacteria	0.7118	-0.0814	0.5637	-0.127	0.6924	-0.0872	0.4408	0.8773	0.0341	0.7503	0.0702	0.5471	-0.4326	-0.1324	0.4363			
AMF	0.0742	-0.3794	*	0.0739	0.0739	0.0739	0.9564	-0.0121	0.0555	-0.4046	0.1366	-0.32	0.6657	0.4999	0.2399	-0.2552		
Fungi	0.092	-0.3595	*	0.0584	0.0584	0.0584	0.2273	-0.2619	0.0935	-0.358	0.0903	-0.3613	-0.0601	0.4964	0.1703	-0.296		

***p < 0.001.
 * p ≤ 0.05.
 ** p < 0.01.

In conclusion, our results show that whole rhizosphere microbial communities can promote maize plant growth and nutrition, which however strongly depends on the balance between N and P fertilization. In addition, microbial assisted nutrient uptake in maize seems to be more important for P than for N.

Acknowledgments

We thank the postgraduate biological sciences program of the National Autonomous University of México for facilitating doctorate biological science training for the first author of this article. We also thank the National Council for Science and Technology (CONACYT) for funding the basic science project 179319. Finally we extend our gratitude to Maribel Nava Mendoza for excellent technical support for P and N measurements.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.rhisph.2018.11.004.

References

Aguilar, R., Carreón-Abud, Y., López-Carmona, D., Larsen, J., 2017. Organic fertilizers alter the composition of pathogens and arbuscular mycorrhizal fungi in maize roots. *J. Phytopathol.* 165, 448–454. <https://doi.org/10.1111/jph.12579>.

Alvarado-Herrejón, M., Larsen, J., Gavito, M.E., Jaramillo-López, P.F., Vestberg, M., Martínez-Trujillo, M., Carreón-Abud, Y., 2018. Relation between arbuscular mycorrhizal fungi, root-lesion nematodes and soil characteristics in maize agroecosystems. *Appl. Soil Ecol.* <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.10.019>. (In press).

Berta, G., Copertta, A., Gamalero, E., Bona, E., Cesaro, P., Scarafoni, A., D'Agostino, G., 2013. Maize development and grain quality are differentially affected by mycorrhizal fungi and a growth-promoting pseudomonad in the field. *Mycorrhiza* 24, 161–170.

Bhadralung, N., Suwanarit, A., Dell, B., Nopamombodi, O., Thamchaipenet, A., Rungchuan, J., 2005. Effects of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi under a maize cropping system. *Plant Soil* 270, 371–382. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1829-4>.

Bremner, J., 1996. Nitrogen - total. In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R., Soltanpour, P., Tabatabai, M., Johnston, C.T., Sumner, M.E. (Eds.), *Nitrogen-total in Methods of Soil Analysis Part 3 - Chemical Methods*, Madison, pp. 1085–1121.

Carvalhois, L.C., Dennis, P.G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M.R., Borriss, R., et al., 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174, 3–11.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y., 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 107–149. <https://doi.org/10.1080/713610853>.

Drinkwater, L.E., Snapp, S.S., 2007. Nutrients in agroecosystems: rethinking the management paradigm. *Adv. Agron.* 92, 163–186. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(04\)92003-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(04)92003-2).

Frostegård, Å., Bååth, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils* 22, 59–65. <https://doi.org/10.1007/BF00384433>.

Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>.

Gryndler, M., Larsen, J., Hřselová, H., Rezáčková, V., Gryndlerová, H., Kubát, J., 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0027-4>.

Gutiérrez-Zamora, M.L., Martínez-Romero, E., 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.* 91, 117–126. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00332-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00332-7).

Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J., 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94, 147–153.

Herridge, D.F., Peoples, M.B., Boddey, R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9668-3>.

Hodge, A., Storer, K., 2014. Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. *Plant Soil* 386, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2162-1>.

Johnson, N.C., Graham, J.H., 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant Soil* 363, 411–419. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1406-1>.

Johnson, N.C., Hoeksema, J.D., Bever, J.D., Chaudhary, V.B., Gehring, C., Klironomos, J.N., Koide, R.T., Miller, R.M., Moore, J., Moutoglou, P., Schwartz, M., Simard, S., Swenson, W., Umbanhowar, J., Wilson, G., Zabinski, C., 2006. From Lilliput to

- Broddingnag: extending models of mycorrhizal function across scales. *Bioscience* 56, 889–900. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)56\[889:FLTBEM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)56[889:FLTBEM]2.0.CO;2).
- Johnson, N.C., Wilson, G.W.T., Wilson, J.A., Miller, R.M., Bowker, M.A., 2015. Mycorrhizal phenotypes and the law of the minimum. *New Phytol.* 205, 1473–1484. <https://doi.org/10.1111/nph.13172>.
- Kuzaykov, Y., Xu, X., 2013. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytol.* 198, 656–669.
- Larsen, J., Jaramillo-Lopez, P., Najera-Rincon, M., Gonzalez-Esquivel, C.E., 2015. Biotic interactions in the rhizosphere in relation to plant and soil nutrient dynamics. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15, 449–463. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000039>.
- Larsen, J., Najera-Rincon, M., Esquivel, C., Gavito, M., 2014. Management of rhizosphere microorganisms in relation to plant nutrition and health. In: *Agroecology, Ecosystems, and Sustainability*. Informa UK. doi: <https://doi.org/10.1201/103-120103-120>, <http://dx.doi.org/10.1201/b17775-6>.
- Larsen, J., Pineda-Sánchez, H., Delgado-Arellano, I., Castellano-Morales, V., Carretero-Montoya, L., Villegas-Moreno, J., 2017. Interactions between microbial plant growth promoters and their effects on maize growth performance in different mineral and organic fertilization scenarios. *Rhizosphere* 3, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.01.003>.
- Leggett, M., Newlands, N.K., Greenshields, D., West, L., Inman, S., Koivunen, M.E., 2015. Maize yield response to a phosphorus-solubilizing microbial inoculant in field trials. *J. Agric. Sci.* 153, 1464–1478.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).
- Olsson, P.A., Bååth, E., Jakobsen, I., Söderström, B., 1995. The use of phospholipid and neutral lipid fatty acids to estimate biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Mycol. Res.* 99, 623–629. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80723-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80723-5).
- Olsson, P.A., 1999. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interaction of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 303–310.
- Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L., Buckler, E.S., Ley, R.E., 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 6548–6553.
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, P., van der Putten, W., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 789–799.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158–160. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3).
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1312, 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>.
- Ratledge, C., Wilkinson, S. G., 1988. *Microbial Lipids*, 1st ed. Academic Press, London.
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305–339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>.
- Richardson, A., Lynch, J., Ryan, P., Delhaize, E., Smith, F., Smith, S., Harvey, P., Ryan, M., Veneklaas, E., Lambers, H., Oberson, A., Culvenor, R., Simpson, R., 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant Soil* 349, 121–156.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 827–837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>.
- Sarabia, M., Cornejo, P., Azcón, R., Carreón-Abud, Y., Larsen, J., 2017. Mineral phosphorus fertilization modulates interactions between maize, rhizosphere yeasts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Rhizosphere* 4, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.09.001>.
- Sarabia, M., Cazares, S., González-Rodríguez, A., Mora, F., Carreón-Abud, Y., Larsen, J., 2018. Plant growth promotion traits of rhizosphere yeasts and their response to soil characteristics and crop cycle in maize agroecosystems. *Rhizosphere* 6, 67–73.
- Sasser, M., 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI technical note 101. MIDI, Newark, DE19711, USA.
- Sawers, R.J.H., Svane, S.F., Quan, C., Grønlund, M., Wozniak, B., Gebreselassie, M.N., González-Muñoz, E., Chávez-Montes, R.A., Baxter, I., Goudet, J., Jakobsen, I., Paszkowski, U., 2017. Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters. *New Phytol.* 214, 632–643. <https://doi.org/10.1111/nph.14403>.
- Smith, S.E., Smith, F.A., Jakobsen, I., 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133, 16–20.
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Ann. Rev. Plant Biol.* 62, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>.
- Thomson, B.D., Robson, A.D., Abbott, L.K., 1992. The effect of long-term applications of phosphorus fertilizer on populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pastures. *Aust. J. Agric. Res.* 43, 1131–1142. <https://doi.org/10.1071/AR.9921131>.
- Toljander, J.F., Santos-González, J.C., Tehler, A., Finlay, R.D., 2008. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microb. Ecol.* 65, 323–338. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00512.x>.
- Treseder, K.K., Allen, M.F., 2002. Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytol.* 155, 507–515. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00470.x>.
- Zitlalpopoca-Hernandez, G., Najera-Rincon, M.B., Del-Val, E., Alarcon, A., Jackson, T., Larsen, J., 2017. Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Soil Ecol.* 115, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.014>.
- Vázquez, M., César, S., Azcón, R., Barea, J.M., 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Appl. Soil Ecol.* 15, 261–272.
- Walters, W.A., Jin, Z., Youngblut, N., Wallace, J.G., Sutter, J., Zhang, W., González-Peña, A., Peiffer, J., Koren, O., Shi, Q., Knight, R., Glavina del Rio, T., Zringle, S.G., Buckler, E.S., Dangl, J.J., Ley, R.E., 2018. Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 7368–7373.

CAPÍTULO III

Chapter 3. Mycorrhizal response in maize depends on soil group, mineral P fertilization, maize genotype and field populations of arbuscular mycorrhizal fungi

Para ser enviado a Rhizosphere



Mycorrhizal response in maize depends on soil group, mineral P fertilization, maize genotype and field populations of arbuscular mycorrhizal fungi

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associate with roots of most crops including maize, and improve host P nutrition. Conservation and management of AMF require information on how they perform under different environmental settings such as soil group and host genotype. In two greenhouse pot experiments we examined the maize plant growth response to native field populations of AMF in three soil group including vertisol, luvisol and andosol, with and without P fertilization, and different maize genotypes including land races (Chalqueño and Mushito) and hybrids (DK2042 and Puma). In the first experiment, Without mineral P fertilization, positive AMF growth responses in the hybrid DK2042 were observed in the three soil group; the higher response was detected in plants grown at the andosol, when compared to vertisol, and to luvisol in which the lowest response was observed. On the other hand, in combination with P fertilization, AMF field populations caused growth depression in the three soils. In the second experiment, maize plant growth response also depended on maize host genotype. In both Vertisol and Andosol all three maize genotypes improved their plant growth after soil disinfection, whereas for the luvisol the plant growth response to soil disinfection depended on maize genotype, where the hybrid Puma and the landrace Chalqueño grew better in non-disinfected soil than disinfected soil, but the opposite was observed for the landrace Mushito. In conclusion, our results show that the maize plant growth response to native populations of AMF strongly depends on soil group and maize genotype as well as mineral P fertilization.

Key words: Agroecology; soil types; maize, arbuscular mycorrhizal fungi

Introduction

Roots of most crops, including maize, associate with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which are major drivers of C, N and P biogeochemical cycling (Larsen et al., 2014) and vital for plant nutrient acquisition in agroecosystems (Gianinazzi et al., 2010). Hence, when developing biologically based strategies for improving crop nutrition these fungi should be integrated as a key component (Drinkwater y Snapp, 2007).

Maize mycorrhizal associations with both single species (Ortas y Akpinar, 2011) and AMF field populations (López-Carmona et al., 2019) have been shown to promote plant growth, though depending on maize genotype (Sawers et al., 2017), and agricultural practices such as tillage (Rosner et al., 2018) and fertilization (Williams et al., 2017). On the other hand, AMF may also cause plant growth suppression when the costs of hosting the fungal root symbionts exceed the benefits in terms of improved P uptake as was the case in Sarabia et al. (2017), where native field populations of AMF caused strong growth suppression in combination with mineral P fertilization. Also in the early plant growth phases transitory growth suppression may occur, which at later stages of the crop phenology, may result in plant growth promotion. This complex parasitism-mutualism continuum has been reviewed thoroughly by Johnson and Graham (2013).

Maize is a crop with high genetic variation and only in Mexico, where maize was first domesticated, and today is recognized 54 landraces have been well characterized, as well as a high number of hybrids are available commercially. Different maize genotypes both land races and hybrids have been adapted to specific environmental conditions such as altitude,

climate and soil group (Sanchez et al., 2000) and also possible adaptation between native AMF and maize genotypes has been suggested (An et al., 2010).

Ryan and Graham (2018) questioned the importance of managing AMF in agroecosystems and called for more field-based evidence of the often claimed benefits of AMF. Along with this, another important limitation is that most studies on AMF are based on single species inoculum and one step to get closer to field conditions is to use AMF field populations in a controlled experimental setting under greenhouse conditions. Along the same line, Yang et al., (2018) multidimensional approach in order to improve our understanding of how mycorrhizal associations perform in agroecosystems including climate, water and nutrient availability and crop genotype, in different agricultural settings. However, it is important to also consider how mycorrhizal associations perform in different soil group , which is an overlooked component (González-Cañizares et al., 2016).

Hence the objective of the present study was to investigate how maize mycorrhizas with different combination of maize genotypes and field populations of AMF perform in different soil group and how soil P status affect these maize-AMF soil interactions. Our main hypothesis was that soil group determines the outcome of maize plant growth response to native AMF. We also tested the hypothesis that native populations of AMF perform better in their soil of origin than in a different soil group.

Materials and methods

Experimental design

Two greenhouse pot experiments each with three factors were performed. Experiment 1 had 24 treatments and 120 experimental units including the factors: 1) Soil group (Vertisol, Luvisol and Andosol), 2) AMF inoculum (Without, AMF-Vertisol, AMF-Luvisol and AMF-Andosol) and 3) Mineral P fertilization (without and with). The second experiment had 18 treatments and 108 experimental units including the factors: 1) Soil group (Vertisol, Luvisol and Andosol), 2) Soil disinfection (sterilized and non-sterilized) and 3) Maize genotype (PUMA (hybrid), Mushito and Chalqueno (landraces)).

Soil

Surface soil (10-20 cm top soil layer) from maize fields were collected in the dry season (may/2017) at three different geographic sites in central Mexico including Irapuato in the state Guanajuato (20°44'52.05"N 101°23'29.66"W), Napizaro in the state Michoacan (19°36'04.0"N 101°41'55.2"W) and Texcoco in the state Estado de Mexico (19°27'27.5"N 98°46'48.8"W). The soil was sieved (0-5 cm mesh) and stored dry in a plastic container under ambient conditions for tow months. Analyses of physical and chemical soil characteristics were performed by an external laboratory (INIFAP) and together with the respective soil group (Table 1). The soil groups were classified based on soil maps of the National Institute of Statistics and Geography (INEGI) of 2000 and world reference base for soil resources 2014 based on analyses physical and chemical.

Maize

The maize hybrid DK2042 (DeKalb) was used in the experiment 1, whereas in the experiment 2 the respective maize varieties grown in the region where the soil had been collected were used. The hybrid Puma (Asgrow) was used in combination with soil from

Irapuato and the landraces "Mushito" and "Chalqueño" in combination with soils from Napizaro and Texcoco, respectively.

AMF field populations

Field populations of AMF used in experiment 1 were propagated with maize as trap plant for 14 weeks according to Alvarado-Herrejón et al., (2018). The soil used for AMF propagation was collected from the experimental field station of the Chapingo Autonomous University, Campus Morelia, Michoacán, Mexico (19°41'08.7"N 101°14'19.5"W). Soil texture was clayish (53.2% clay, 27.3% silt and 19.5% sand) and contained 2.7% organic matter, 23.2 mg kg⁻¹ inorganic nitrogen, 5.8 mg kg⁻¹ available phosphorus (Olsen P) and pH (H₂O) was 7.3. Soil was mixed with quartz sand (1:1, w:w) and disinfected in an autoclave (1 h, 120°C). The AMF species were identified from the three maize fields and also in the AMF inoculum obtained after propagation with maize as trap plant (Table 2) according to Alvarado-Herrejón et al., (2018).

Experimental conditions

In both experiments was used a mixture of soil: sand (w/w) contained in 1.5 liter pots with 1.4 kg sterile soil:sand mix (1:1, w:w). Plants were grown under greenhouse conditions for 10 weeks and watering was performed on a daily basis to maintain 80% of the water holding capacity by weight. Inoculum of native field populations of AMF for the first experiment was 10% of total pot soil-sand content mixed into the soil-sand mix prior sowing in accordance to their respective treatments. Mineral fertilizers were mixed into the soil-sand mix in accordance with the treatments with and without P in experiment 1 and without P in experiment 2. Other nutrients were applied in both experiment 1 and 2 in the

following amounts (mg): K_2SO_4 (105), $CaCl_2$ (105), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (2.94), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (7.56), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (14.7), $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.55), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (63), and $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$ (0.25). Nitrogen was applied as NH_4NO_3 every week with 30 mg N when plants were three weeks old and until one week before harvest (210 mg N in total). In experiment 1 P was applied as KH_2PO_4 (100 mg P) prior sowing in the treatments with P. In experiment 2 plants were kept without P fertilization.

Harvest and analysis

Plants were harvested 10 weeks after sowing. Roots were detached from shoots and washed and separately oven-dried at 80°C for 48 h, and weighed. Mycorrhizal growth response (MGR) was calculated as a simple response ratio as described in Johnson et al., (2010): $LN(AM/NM)$, where AM was the total dry weight of mycorrhizal plants of same fertilization treatment, and NM was each total dry weight of each mycorrhizal plant of same fertilization treatment with AMF. Afterwards, fresh roots were cut in 0.5 – 1 cm segments and mixed in water from which a two grams sample was obtained for measuring AMF root colonization. Root subsamples were cleared and stained according to Phillips and Hayman (1970) and examined for AMF root colonization using the line-intercept method as described by (Giovannetti y Mosse, 1980).

Statistical analysis

For both experiments three way analyses of variance (ANOVA) were performed with the software StatGraphics Centurion XV.II. and graphs were produced with GraphPad Prism 5. Prior ANOVA variance homogeneity was verified with the Bartlett test. Comparisons between treatment means were performed with post hoc LSD tests for significant factors

and their interactions. Means of AMF root colonization were arcsine transformed prior ANOVA.

Results

Experiment 1

Significant three way “Soil × AMF × P fertilization” interactions were observed for shoot and root dry weight and AMF root colonization (Table 3). Overall P fertilization increased shoot and root dry weight without AMF inoculum (Figure 1a, b). Without P fertilization AMF inoculum increased both shoot and root dry weight in maize grown in Vertisol and Andosol (Figure 1a,b), whereas in the Luvisol , only the AMF inoculum from the Vertisol increased the shoot dry weight (Figure 1a). With P fertilization the AMF Luvisol inoculum caused shoot growth suppression in all three soils (Figure 1a), whereas the AMF inoculum from Vertisol and Andosol had no effect on shoot dry weight except for maize grown in Andosol where the AMF Andosol inoculum also caused shoot growth suppression (Figure 1a). A similar response was observed for root dry weight, except that P fertilization also resulted in decreased root dry weight in Luvisol with the AMF Vertisol inoculum and in Andosol with the AMF Andosol inoculum (Figure 1b).

Significant two-way interactions were observed for the interactions “Soil × Fertilization” and “AMF × Fertilization” for mycorrhiza growth response (Table 3). Overall positive and negative mycorrhiza growth responses were observed without and with P fertilization, respectively (Figure 2). Without P fertilization highest mycorrhiza growth response was observed in the Andosol, intermediate in the Vertisol and lowest and the Luvisol (Figure 2a). With P fertilization the strongest mycorrhiza growth suppression was observed in the

Andosol, whereas the mycorrhiza growth suppressions in Vertisol and Luvisol were similarly lower than in the Andosol (Figure 2a). Without P fertilization the Vertisol, Luvisol and Andosol AMF inoculum caused respectively the highest, intermediate and lowest positive mycorrhiza growth response (Figure 2b). With P fertilization all AMF inoculum caused negative mycorrhiza growth response, the AMF Luvisol inoculum the strongest growth suppression and the two other AMF inoculum had similar and lower effects than the AMF luvisol inoculum (Figure 2b).

Also a significant three way “Soil \times AMF \times P fertilization” interaction was observed for AMF root colonization (Table 3). P fertilization reduced AMF root colonization with the AMF Vertisol inoculum in all three soils (Figure 4a). The AMF root colonization with the AMF Luvisol inoculum was unaffected by both P fertilization and soil group (Figure 4a). For the AMF Andosol inoculum P fertilization reduced AMF root colonization of plants grown in the Vertisol (Figure 4a). P fertilization had no effect on AMF root colonization of plants grown in Luvisol and Andosol. For the AMF Andosol and Vertisol inoculum the AMF root colonization was highest in Andosol, whereas for the Luvisol inoculum AMF root colonization was similarly high irrespective of soil group and P fertilization (Figure 4a).

Experiment 2

Significant “Soil group \times Maize genotype \times Soil disinfection” interactions were observed for shoot and root dry weight (Table 3). Soil disinfection of the Luvisol reduced shoot dry weight of the maize genotype Puma and Chalqueño, whereas in the genotype Mushito disinfection of Luvisol increased shoot dry weight (Figure 3a). In the remaining soil group

and maize genotype combinations soil disinfection increased shoot dry weight though not always significantly (Figure 3a). Disinfection of the Luvisol markedly increased root dry weight in all maize genotypes, whereas disinfection of the Andosol reduced the root dry weight of all maize genotypes (Figure 3b). Disinfection of the Vertisol had no effect on root dry weight in all maize genotypes (Figure 3b). Positive mycorrhiza growth response was observed for the genotype Puma and Chalqueño in the Luvisol, whereas for all other combinations of maize genotype and soil group negative mycorrhiza growth responses were observed (Figure 3c).

A significant “Soil group \times Maize genotype” interaction was observed for AMF root colonization (Table 3). AMF root colonization was lower in maize grown in the Andosol than in the two other soils irrespective of maize genotype (Figure 4b). In the Luvisol AMF root colonization was higher in Puma and Mushito compared to Chalqueño, whereas in the Vertisol the AMF root colonization was higher in Mushito and Chalqueño compared to that of Puma (Figure 4b).

Discussion

The mycorrhizal growth response in maize resulted as highly depending on soil type, thus, confirming our main hypothesis. However, the hypothesis concerning on the environmental adaptation of native communities of AMF at field conditions was not confirmed since the AMF performance overall, was similar in all soil group.

Soil provides the basis for crop production, this provision is determined mainly by nutrient availability and dynamics in the respective soils (Drinkwater y Snapp, 2007). Information about how soil chemical characteristics influence the abundance, community composition

and function of AMF is manifold (Alvarado-Herrejón et al., 2018; Carballar-Hernández et al., 2017; Pánková et al., 2014), but information about how soil group affect AMF performance is highly limited (Herrera-Peraza et al., 2011). Results from the present study show that mycorrhiza growth response was highest in the Andosol , intermediate in the Vertisol and lowest in the Luvisol , which seems to be linked to soil P level since the soil P level was markedly lower in the Andosol (7.1 mg kg⁻¹ soil) and the Vertisol (9.4 mg kg⁻¹ soil) compared to high soil P level in the Luvisol (34.8 mg kg⁻¹ soil). However, more detailed studies on the performance of AMF in different soils are needed to understand the underlying mechanisms and hence better integration of AMF functionality in agroecosystems.

Growth promotion in maize by AMF as observed in the present study is common both with singles species of AMF (Munkvold et al., 2004; Ortas y Akpınar, 2011; Thomson et al., 1992), field communities (Gavito y Miller, 1998; Klironomos, 2003) and though depending on maize genotype (Sawers et al., 2017). According with us results, López-Carmona et al., (2019) reported that native AMF can stimulate plant growth with P limitation but not with N limitation, but fertilization with N and P may result in growth depression. It effects were attributed to higher energetic costs, in terms of carbon, of keep the mycorrhizal symbiosis than the benefits in N or P acquisition by AMF (Johnson y Graham, 2013).

The maize genotypes included in the present study responded different to the AMF inoculation confirming the results described by Sawers et al., (2017). In the first experiment without P fertilization the hybrid DK 2042 showed positive response to all AMF inocula in all soil types, which is in accordance with other similar studies with this maize genotype and field populations of AMF (Sarabia et al., 2017; Zitlalpopoca-Hernandez et al., 2017). In

the second experiment, soil disinfection caused growth suppression in the hybrid PUMA, but growth promotion in the remaining maize land races. Soil disinfection eliminated the native AMF and other soil microbiota; however, seed-borne saprotrophic microorganisms can be re-established in the rhizosphere as the root development occur (Gryndler et al., 2006). Although AMF does not survive in seeds, they may proliferate due to the germination of resting spores in soil (Ortas y Akpınar, 2011). Hence in this way soil disinfection has been used to examine plant mycorrhizal dependency. The improved growth in landraces after eliminating AMF, even in low P soil, suggests a high carbon cost to establish the mycorrhizal symbiosis and that these genotypes are not depending on the mycorrhizal P acquisition pathway in low P soil, probably because they have other physiological or growth mechanisms to acquire P (Calderón-Vázquez et al., 2009).

Independent of soil group, the AMF inoculum from the Andosol stimulated the highest plant growth promotion for the treatments of without P fertilization, which coincided with the highest AMF root colonization. On the other hand, with P fertilization, the AMF inoculum from the Luvisol resulted in the strongest growth suppression of plants that showed the highest AMF root colonization. These results confirm the mutualism-parasitism continuum theory (Johnson y Graham, 2013) which indicates that the benefit of hosting AMF in terms of plant growth, depends on the carbon costs invested for the symbiosis relative to the P acquisition benefits.

Mineral P fertilization has been shown to reduce AMF root colonization of both single species (Treseder y Allen, 2002) and AMF field communities (Svenningsen et al., 2018). In the present study no clear response of AMF root colonization from mineral P fertilization

was observed, since the P effects depended on all factors studied including soil group, maize genotype and AMF inoculum.

Ecological adaptation of AMF to their environmental conditions has been suggested as the main driver of the interactions between AMF and their host (Lambert et al., 1980; Johnson et al., 2010; Pánková et al., 2014; Rúa et al., 2016). Also, it is suggested that indigenous AMF perform better in origin's soil than exotic soil (Ji et al., 2013). However, this was not supported with the results from the present study, which may be related to experimental conditions and context. Nevertheless most likely indigenous communities of AMF can adapt to agricultural practices (An et al., 2010). The environmental factors that mainly shape the AMF community in agroecosystems are related to nutrient availability (N and P mainly), and mycorrhizal crop dependency (Yang et al., 2018), as well as agricultural practices such as tillage, fertilization and pesticide application that may cause significant changes in AMF communities (Chen et al., 2018).

In conclusion, results show that mycorrhizal growth response in maize due to native AMF populations strongly depends on soil type and maize genotype as well as on mineral P fertilization. Overall, soil P levels seem to be the main driver of the outcome of maize and AMF interactions where low and high P levels can result in plant growth promotion or suppression, though depending on soil type, maize genotype, and AMF community.

References

- Alvarado-Herrejón, M., Larsen, J., Gavito, M.E., Jaramillo-López, P.F., Vestberg, M., Martínez-Trujillo, M., Carreón-Abud, Y., 2018. Relation between arbuscular mycorrhizal fungi, root-lesion nematodes and soil characteristics in maize agroecosystems. *Appl. Soil Ecol.* <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2018.10.019>
- An, G.H., Kobayashi, S., Enoki, H., Sonobe, K., Muraki, M., Karasawa, T., Ezawa, T., 2010. How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasm. *Plant Soil* 327, 441–453. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0073-3>

- Calderón-Vázquez, C., Alatorre-Cobos, F., Simpson-Williamson, J., Herrera-Estrella, L., 2009. Maize under phosphate limitation, en: *Handbook of maize: Its biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 381–404. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1_19
- Carballar-Hernández, S., Hernández-Cuevas, L.V., Montañón, N.M., Larsen, J., Ferrera-Cerrato, R., Taboada-Gaytán, O.R., Montiel-González, A.M., Alarcón, A., 2017. Native communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Capsicum annum* L. respond to soil properties and agronomic management under field conditions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 245, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.004>
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., Reinhardt, D., 2018. Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi – from ecology to application. *Front. Plant Sci.* 9, 1270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>
- Drinkwater, L.E., Snapp, S.S., 2007. Nutrients in Agroecosystems: Rethinking the management paradigm. *Adv. Agron.* [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(04\)92003-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(04)92003-2)
- Gavito, M.E., Miller, M.H., 1998. Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant Soil* 198, 185–192. <https://doi.org/10.1023/A:1004314406653>
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.N., van Tuinen, D., Redecker, D., Wipf, D., 2010. Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- González-Cañizares, P., Ramírez-Pedroso, J., Rivera-Espinosa, R., Hernández-Jiménez, A., Crespo-Flores, G., 2016. Efectividad de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en dos leguminosas forrajeras cultivadas en dos tipos de suelo. *Trop. Grasslands-Forrajes Trop.* 4, 82–90. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(4\)82-90](https://doi.org/10.17138/TGFT(4)82-90)
- Gryndler, M., Larsen, J., Hršelová, H., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., Kubát, J., 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0027-4>
- Herrera-Peraza, R.A., Hamel, C., Fernández, F., Ferrer, R.L., Furrázola, E., 2011. Soil–strain compatibility: the key to effective use of arbuscular mycorrhizal inoculants? *Mycorrhiza* 21, 183–193. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0322-6>
- Ji, B., Gehring, C.A., Wilson, G.W.T., Miller, R.M., Flores-Rentería, L., Johnson, N.C., 2013. Patterns of diversity and adaptation in Glomeromycota from three prairie grasslands. *Mol. Ecol.* 22, 2573–2587. <https://doi.org/10.1111/mec.12268>
- Johnson, N.C., Graham, J.H., 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant Soil.* <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1406-1>
- Johnson, N.C., Wilson, G.W.T., Bowker, M.A., Wilson, J.A., Miller, R.M., 2010. Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2093–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906710107>
- Klironomos, J.N., 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84, 2292–2301. <https://doi.org/10.1890/02-0413>
- Lambert, D.H., Cole, H., Baker, D.E., 1980. Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytol.* 85, 513–520. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb00766.x>
- Larsen, J., Nájera-Rincon, M., Esquivel, C., Gavito, M., 2014. Management of rhizosphere microorganisms in relation to plant nutrition and health, en: *Agroecology, Ecosystems, and Sustainability*. Informa UK. <https://doi.org/103-120>. doi:10.1201/b17775-6
- López-Carmona, D.A., Alarcón, A., Martínez-Romero, E., Peña-Cabriales, J.J., Larsen, J., 2019. Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios. *Rhizosphere* 9, 38–46. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2018.11.004>
- Munkvold, L., Kjølner, R., Vestberg, M., Rosendahl, S., Jakobsen, I., 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 164, 357–364. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x>
- Ortas, I., Akpınar, Ç., 2011. Response of maize genotypes to several mycorrhizal inoculums in terms of plant growth, nutrient uptake and spore production. *J. Plant Nutr.* 34, 970–987. <https://doi.org/10.1080/01904167.2011.555580>
- Pánková, H., Münzbergová, Z., Rydlová, J., Vosátka, M., 2014. Co-adaptation of plants and communities of

- arbuscular mycorrhizal fungi to their soil conditions. *Folia Geobot.* 49, 521–540. <https://doi.org/10.1007/s12224-013-9183-z>
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158–160. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Rosner, K., Bodner, G., Hage-Ahmed, K., Steinkellner, S., 2018. Long-term soil tillage and cover cropping affected arbuscular mycorrhizal fungi, nutrient concentrations, and yield in sunflower. *Agron. J.* 110, 2664–2672. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.03.0177>
- Rúa, M.A., Antoninka, A., Antunes, P.M., Chaudhary, V.B., Gehring, C., Lamit, L.J., Piculell, B.J., Bever, J.D., Zabinski, C., Meadow, J.F., Lajeunesse, M.J., Milligan, B.G., Karst, J., Hoeksema, J.D., 2016. Home-field advantage? evidence of local adaptation among plants, soil, and arbuscular mycorrhizal fungi through meta-analysis. *BMC Evol. Biol.* 16, 122. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0698-9>
- Ryan, M.H., Graham, J.H., 2018. Little evidence that farmers should consider abundance or diversity of arbuscular mycorrhizal fungi when managing crops. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.15308>
- Sanchez, G.J., Goodman, M.M., Stuber, C.W., 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Econ. Bot.* 54, 43–59. <https://doi.org/10.1007/BF02866599>
- Sarabia, M., Cornejo, P., Azcón, R., Carreón-Abud, Y., Larsen, J., 2017. Mineral phosphorus fertilization modulates interactions between maize, rhizosphere yeasts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Rhizosphere* 4, 89–93. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2017.09.001>
- Sawers, R.J.H., Svane, S.F., Quan, C., Grønlund, M., Wozniak, B., Gebreselassie, M.N., González-Muñoz, E., Chávez Montes, R.A., Baxter, I., Goudet, J., Jakobsen, I., Paszkowski, U., 2017. Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters. *New Phytol.* 214, 632–643. <https://doi.org/10.1111/nph.14403>
- Svenningsen, N.B., Stephanie, •, Watts-Williams, J., Joner, E.J., Battini, F., Aikaterini Efthymiou, •, Cruz-Paredes, C., Nybroe, O., Jakobsen, • Iver, 2018. Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. *ISME J.* 12, 1296–1307. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0059-3>
- Thomson, B.D., Robson, A.D., Abbott, L.K., 1992. The effect of long-term applications of phosphorus fertilizer on populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pastures. *Aust. J. Agric. Res.* 43, 1131–1142. <https://doi.org/10.1071/AR9921131>
- Treseder, K.K., Allen, M.F., 2002. Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: A model and field test. *New Phytol.* 155, 507–515. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00470.x>
- Williams, A., Manoharan, L., Rosenstock, N.P., Olsson, P.A., Hedlund, K., 2017. Long-term agricultural fertilization alters arbuscular mycorrhizal fungal community composition and barley (*Hordeum vulgare*) mycorrhizal carbon and phosphorus exchange. *New Phytol.* 213, 874–885. <https://doi.org/10.1111/nph.14196>
- Yang, H., Schroeder-Moreno, M., Giri, B., Hu, S., 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi and their responses to nutrient enrichment, en: Giril, B., Prasad, R., Varma, A. (Eds.), *Root Biology*. Springer, Cham, pp. 429–449. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_17
- Zitlalpopoca-Hernandez, G., Najera-Rincon, M.B., Del-Val, E., Alarcon, A., Jackson, T., Larsen, J., 2017. Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Soil Ecol.* 115, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.014>

Table 1 Physical and chemistry properties of Vertisol, Andosol and Luvisol used for maize growth and AMF inoculum propagation

State	Soil	OM (%)	N (ppm)	P (ppm)	K (ppm)	pH (ppm)	Sand / Clay / Silt	Texture
Guanajuato	Vertisol	1.51	14.8	9.35	772	7.04	34.7 / 45.9 / 19.2	clay franc
Estado de México	Andosol	2.82	13.4	7.08	140	5.91	61.8 / 10.9 / 27.2	sandy clay
Michoacán	Luvisol	2.15	12	34.8	102	5.08	39.8 / 26.9 / 33.2	clay loam
AMF inoculum propagation	Luvisol	2.74	23.2	5.8	303	7.28	19.4 / 53.2 / 27.2	clay loam

Table 2 Species of AMF recovered from inoculum in terms of AMF spores, which corresponds to rhizosphere soil from maize AMF tramp cultures propagated with rhizosphere soil collected in maize fields in Guanajuato, Michoacán and Estado de Mexico, México (Alvarado-Herrejón et al., 2018)

AMF species	Vertisol	Luvisol	Andosol
<i>Acaulospora spinosa</i>			X
<i>Funneliformis mosse</i>			X
<i>Gigaspora margarita</i>		X	
<i>Gigaspora decipiens</i>		X	X
<i>Gigaspora albida</i>	X		
<i>Gigaspora decipiens</i>			
<i>Rhizophagus irregularis</i>		X	X
<i>Scutellospora calospora</i>		X	X

Table 3 P-values of analysis of variance estimated in the two experiments

Factores	Shoot dry	Root dry	Mycorrhizal growth response	AMF colonization
Experiment one				
A: Soil	***	***	***	***
B: AMF	***	0.6939	**	***
C:Fertilization	***	***	***	***
AB	0.1451	*	0.5516	***
AC	***	0.0987	***	*
BC	***	***	***	***
ABC	**	**	0.6844	**
Experiment 2				
A: Soil	***	***	***	***
B: Maize genotype	***	***	***	0.3361
C: Soil disinfection	0.197	***	---	---
AB	***	**	***	***
AC	***	***	---	---
BC	***	***	---	---
ABC	***	***	---	---

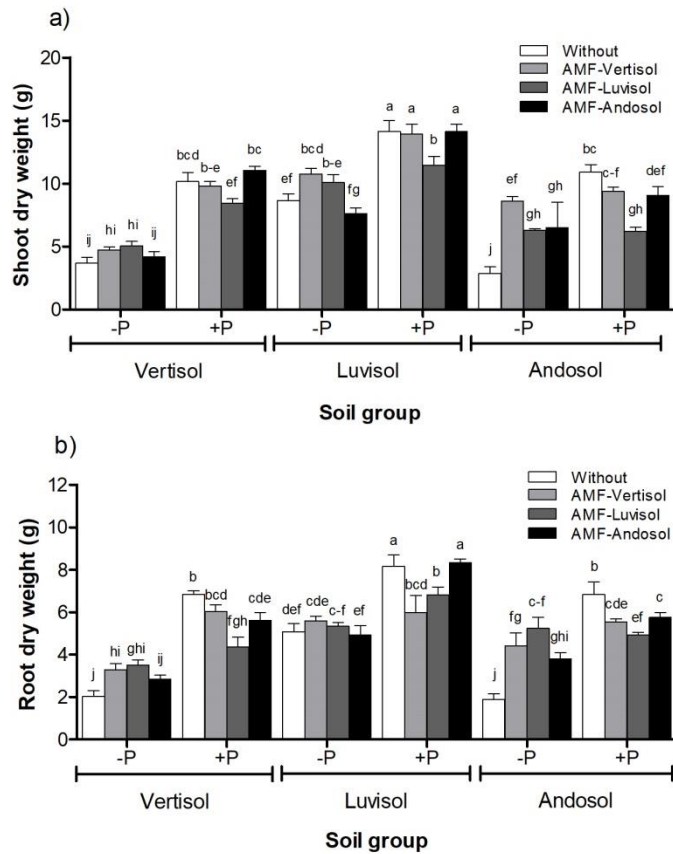


Figure 1 Root (a) and shoot (b) growth of maize in three soils (Vertisol, Luvisol and Andosol) with and without native AMF inoculum. All treatments had basic fertilization differing only in phosphorus with (+P) and without (-P). Values represent treatment means with standard error bars (n = 4). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA test (LSD, $p \leq 0.05$).

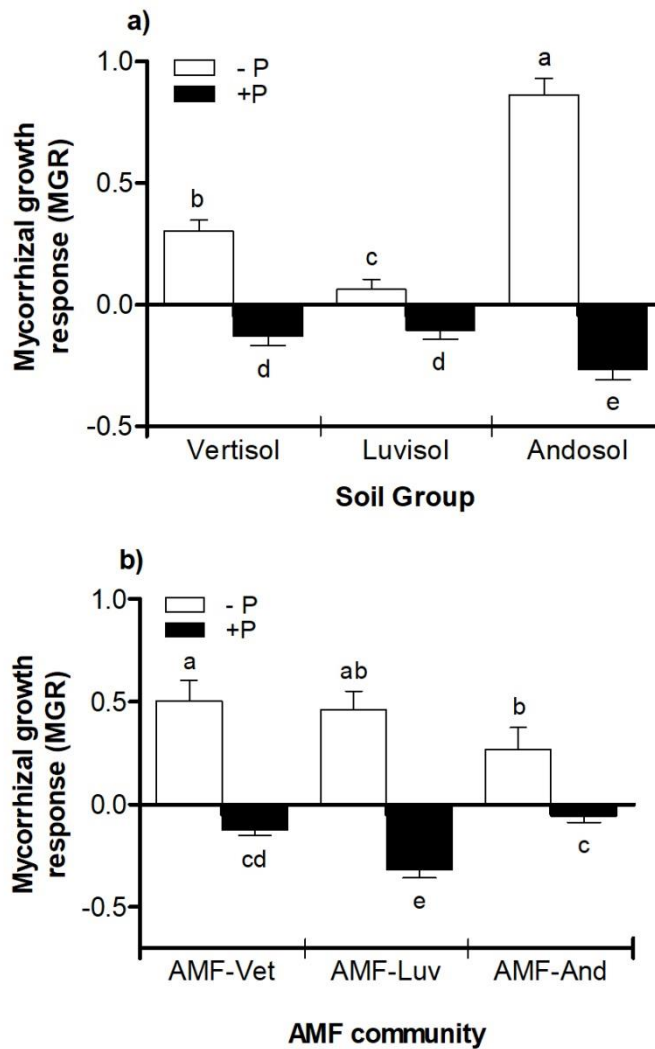


Figure 2 Mycorrhizal growth response (MGR) of maize growth of two ANOVA interactions, (a) soil (Vertisol, Luvisol and Andosol) and (b) AMF inoculum per fertilization with (+P) and without (-P) phosphorus. The plants of both analysis grew for ten weeks. Values represent treatment means with standard error bars (n = 4). Treatments with different letters are significantly different according to LSD test ($p \leq 0.05$).

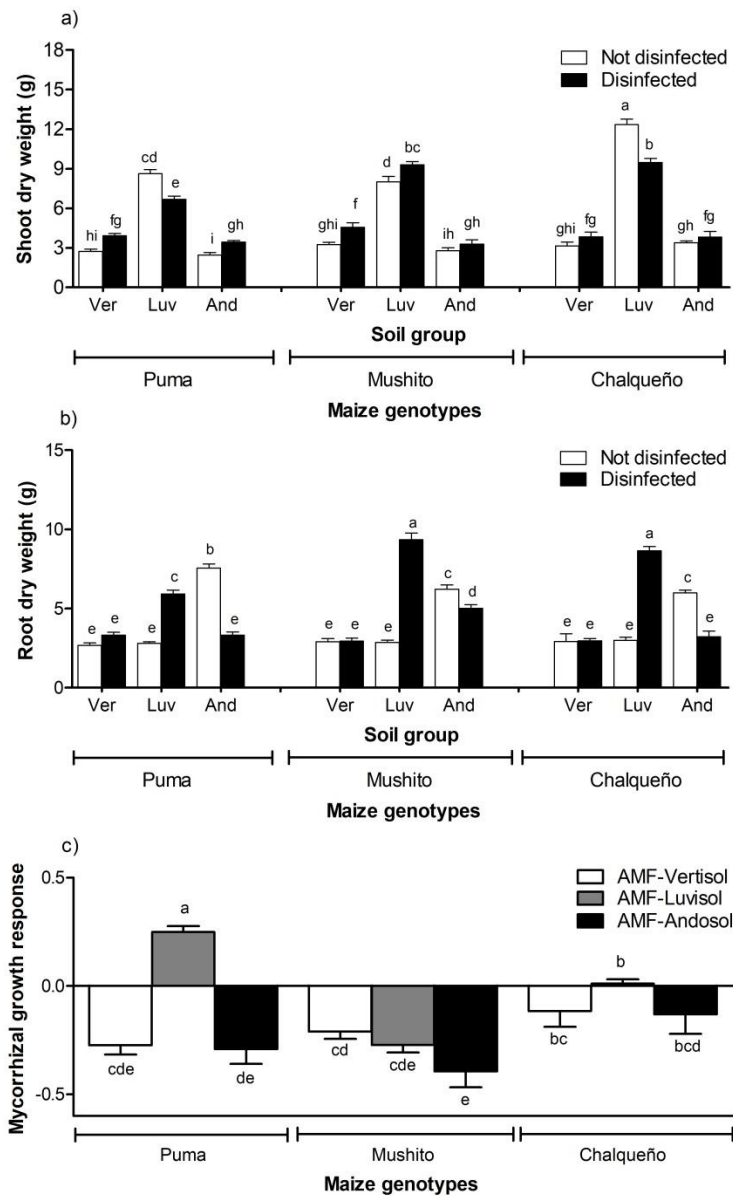


Figure 3 Root (a) and shoot (b) growth of three maize genotypes (Puma, Mushito and Chalqueño) in three soil (Vertisol, Luvisol and Andosol) disinfected or not. Values represent treatment means with standard error bars (n = 4). Treatments with different letters are significantly different according to post hoc ANOVA LSD test ($p \leq 0.05$).

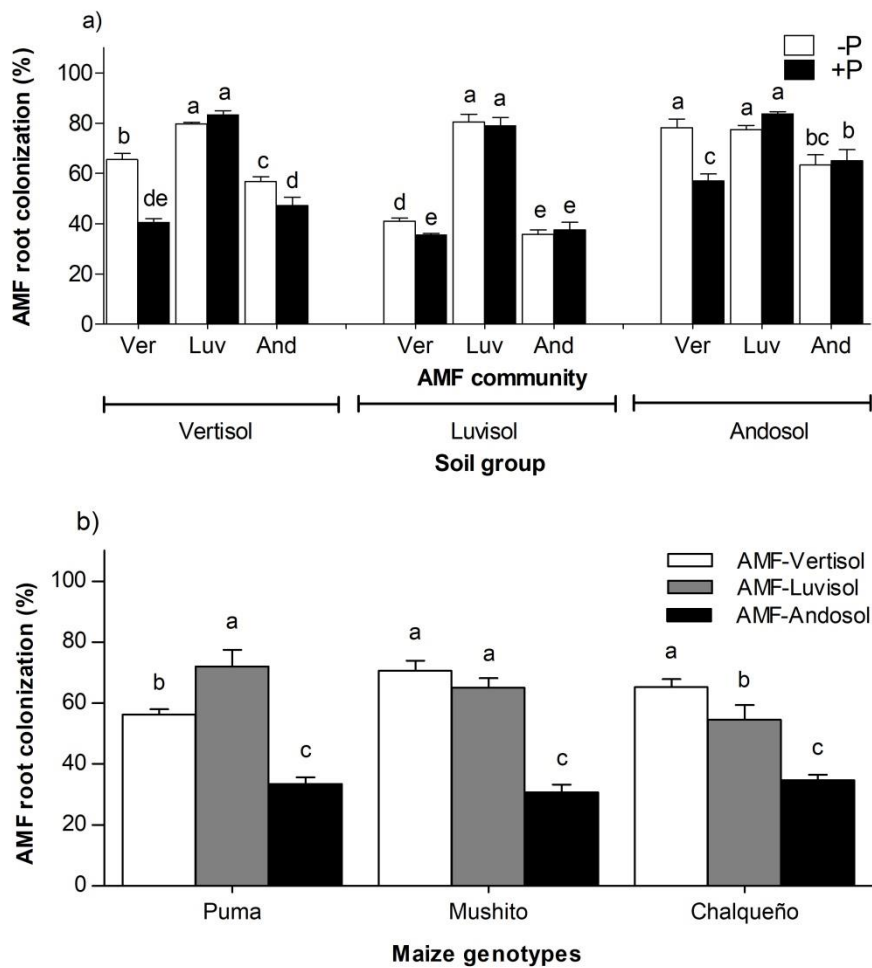


Figure 4 AMF root colonization of a) triple ANOVA interaction: soil (Vertisol Luvisol and Andosol) × AMF community (Vertisol, Luvisol and Andosol) × fertilization (with (+P) and without (-P) phosphorus); and b) double interaction: maize genotypes (Puma, Mushito and Chalqueño) × AMF community (Vertisol, Luvisol and Andosol).

CAPÍTULO IV

Chapter 4. Field populations of arbuscular mycorrhizal fungi regulate water stress response in maize



Field populations of arbuscular mycorrhizal fungi regulate water stress response in maize

Abstract

One of the principal effects of climate change is the modification of the rainfall regime and the increase of more prolonged periods of drought. It is estimated that the loss of maize yield can increase owing to drought. It has been proposed that AMF have the capacity to reduce water stress conditions of different crop species, nevertheless, it is not well-known which the maize genotype influences their mycorrhizal interactions under drought conditions. To determine if the native populations of microorganisms can reduce the water stress of three maize genotypes, an experiment was performed with three factors: F1: maize genotypes (drought-sensitive hybrid and two landraces genotypes Mushito and Chalqueño); F2: AMF inoculation (with and without inoculum); and F3: water stress (65 and 100% of field capacity). The maize plants growth was for ten weeks in pots in greenhouse with controlled temperature. The AMF inoculation reduced the oxidative damage estimated from peroxides and oxidative damage to lipids in foliage and roots only in hybrid genotype, but in both landraces higher oxidative damage. In addition, AMF induced metabolites of protection such as glutathione (mmol g^{-1}) and proline ($\mu\text{mol g}^{-1}$) in the hybrid genotypes on water stress. With water stress, the mycorrhizal colonization was significantly higher in Mushito but lower in hybrid, and without differences in Chalqueo. We conclude that the native AMF have the ability to reduce water stress, but such beneficial effect depends on maize genotype.

Introduction

From the beginning of the 21st century, climate change has been the principal impact from modern human activities, and it affects the distribution and availability of fresh water in the world. The water available for agriculture has been reduced, while the population that depends on agriculture has increased (Vörösmarty et al., 2000). In this sense, climate change has put the food security of the population at risk through the changes in the water available for agriculture either from irrigation or from temporary (Elliott et al., 2014; Schmidhuber y Tubiello, 2007). In addition, many places of the world, maize is cultivated only with available rainwater, consequently the plants frequently suffer water stress and thus losses in the crop yield. It is estimated that because of climate change, the maize crop could lose at least 10% of its yield at the global level, but at the local level it could cease being a cultivable plant because of water limitation (Jones y Thornton, 2003; Murray-Tortarolo et al., 2018).

Osmotic stress or water stress can be defined as an imbalance of water content in plants tissues that can modify their optimal functions (Aroca et al., 2012). Water stress can be induced by fluctuations in the relative humidity of the atmosphere or through the low osmotic potential in soil (Morgan, 1984). Osmotic stress can activate response genes to cause the synthesis of the molecules of protection, to modify physiological processes like the stomatal closure and to induce changes in the plant growth (Urano et al., 2010). Water stress in plants can cause oxidative damage in structural and metabolic components because of the accumulation of free oxygen, superoxides, hydrogen peroxides and hydroxides (Blokhina et al., 2003). The damage produced by the reactive oxygen species in plants subjected to drought can be estimated as the content of 2-thiobarbituric acid (TBARS), and hydrogen peroxide in both roots and foliage (Anjum et al., 2016).

It is well-known that the plants have the capacity to synthesize ions, antioxidants, proteins, amino acids, sugars, polyols, polyamides and carotenoids, which confer protection to the tissues, membranes and molecules against the effects of water stress (Bohnert y Jensen, 1996). Easily degraded sugars, such as sucrose or glucose, can offer available energy for the synthesis of other more complex compounds like proline and antioxidants, which require a lot of energy for their synthesis. The derivatives of photosynthesis can confer

protection to plants when an event of osmotic stress may occur (Hare et al., 1998). Proline is an amino acid commonly used as an indicator of the presence of water stress in plants, thus acting as an osmotic regulator, among other functions (Ashraf y Foolad, 2007). Antioxidant compounds play an important role in water stress alleviation. For instance, glutathione a nonprotein tripeptide composed of three amino acids glutamate, cysteine and glycine can act as an antioxidant that protect plants against the accumulation of reactive oxygen species due to water stress (Mittler, 2002).

A biological mechanism of plants for avoiding the negative effects of abiotic stress is the establishment of mycorrhizal symbiosis, which can be defined as the ecological interaction between one or various species of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and the roots of the plants. The AMF obtain from roots a niche and carbon source, while the plants are rewarded by the nutrient facilitation from soil, water uptake, and the protection against different types of biotic and abiotic stress (Smith y Smith, 2011). It has been proposed that the effect of the AMF on their hosts can have a wide range of interactions that come from mutualism to parasitism (Klironomos, 2003). In addition, the functional compatibility between both symbionts, the environment and the genotype of the plants are the elements that define the type of ecological interaction that AMF establish with their hosts (Johnson et al., 2006, 2015). The AMF have the ability to stimulate physiological plant mechanisms in response to osmotic stress through protection against oxidative damage, stimulation of osmolytes synthesis, reduction of the osmotic power of the tissues, transportation of water from the soil to the plants through their hyphae, regulation of the hydraulic properties of the roots and the improvement of plant gas exchange (Ruiz-Lozano et al., 2012). It has been reported that the AMF have the capacity to stimulate the synthesis of osmolytes, such as proline, sugars, and antioxidants, to maintain the gas exchange in plants, and to promote the activity of aquaporins in maize plants under water stress conditions (Armada et al., 2015; Bárzana et al., 2015; Quiroga et al., 2017).

Because of its economic, cultural and biological value, maize is the most important cultivated plant around the world. Maize has multiple uses, among them the following stand out: animal consumption as forage, human consumption in a direct way, or transformed into flour or corn syrup as well as used for ethanol production (Ranum et al.,

2014). The maize is a domesticated species that has a high genetic variation among its native breeds. Only in México, one of the most accepted classifications of maize describes 59 different classified races based on biochemical markers and morphological attributes (Sanchez et al., 2000). The native races of maize are the basis for the genetic material of the modern varieties of maize and breeding. In addition, the native races of maize have been diversified from populations that have received the genetic flow from improved genotypes and are adapted to multiple local environmental conditions, such as the climate, the soil, the altitude, and even farming management practices. Thus, in the present work, we hypothesize that the capacity of the native AMF for promoting physiological response mechanisms that lessen water stress is independent of the maize genotype.

Materials and methods

Experimental design

A factorial design with three factors was established: (1) Maize genotype (two landraces and one hybrid). (2) Community of native AMF and without native AMF (with only a filtering of microorganisms from the native inoculum applied). (3) Irrigation (100 and 65% of field capacity (CC)). In total, there were 12 treatments, six repetitions and 72 experimental units.

Biological materials

The sampling of rhizosphere soil of maize to propagate inoculum was performed in November 2013 in the senescence plants growth stage in a field with rainfed in Napizaro, Michoacan (19°41'9.43"N, 101°14'18.34"W). The rhizosphere soil was classified as : Fragic Luvisol (Clayic, Cutanic, Profundic). A representative sample was taken of maize rhizosphere soil through five subsamples (one in each corner of the plot (four) and one in the center of the plot). From each of the five sampling points complete 30 × 30 × 30 cm blocks of soil were excavated with the plant stem as the centre. The samples was marked and transferred to laboratory for processing and analyses. Each sample was sifted for remove large organic matter and macro fauna, thereafter, all samples of maize rhizosphere

was homogeneously mixed.

Soil used for propagating the microbial inoculum was collected from the experimental field station of the Chapingo Autonomous University, Campus Morelia, Michoacan, Mexico (19°41'9.43"N, 101°14'18.34"W). Soil texture was clayish (53.2% clay, 27.3% silt and 19.5% sand) and contained 2.7% organic matter, 23.2 mg kg⁻¹ inorganic nitrogen, 5.8 mg kg⁻¹ available phosphorus (Olsen P) and pH (H₂O) was 7.3. Soil was mixed with quartz sand (1:1, w:w) and disinfected in an autoclave (1 h, 120 °C).

Inoculum with whole communities of rhizosphere microorganisms was propagated using maize (*Zea mays* L, DK2041) as trap plants grown under greenhouse conditions. Maize seeds were sown in 3 L pots with 3 kg sterile soil:sand substrate (1:1, w/w) inoculated with maize field rhizosphere soil (10%) and without inoculation for the control treatment. Prior sowing all basic fertilizers excepting P, were applied in the following (mg kg⁻¹): K₂SO₄ (105), CaCl₂ (105), CuSO₄ · 5H₂O (2.94), ZnSO₄ · 7H₂O (7.56), MnSO₄ · H₂O (14.7), CO₂SO₄ · 7H₂O (0.55), MgSO₄ · 7H₂O (63), and Na₂MoO₄ · 7H₂O (0.25). P fertilization was omitted in order to promote formation of the maize mycorrhiza association. N was applied as NH₄NO₃ corresponding to 50 mg N every second week starting two weeks after sowing and ending one week before harvesting resulting in a total of 200 mg N applied. Greenhouse temperature was approximately 15 °C at night and 25–30 °C during daytime. Plants were watered by weight on a daily basis to maintain 70% of the water holding capacity. Fifteen weeks after sowing when maize plants had reached the flowering stage plants and soil were left to dry for two weeks in the greenhouse. Roots were extracted from the dry soil, cut into 5–10mm pieces and mixed carefully into the soil. This mix of substrate with root segments was used as inoculum of whole rhizosphere microbial communities. The AMF species in the inoculum were identified with spore morphology (Alvarado-Herrejón et al., 2018) (Supplementary Table 1).

Two maize landraces were collected from San Pablo Ixayoc, Estado de México (19°28'15.7"N 98°47'35.0"W) and the Napízaro community of Michoacán (19°36'04.0"N 101°41'56.2"W) both located in Mexico. In addition, the drought-sensitive hybrid maize FAO 500 (PR34B39) from the DuPont Pioneer seed company was used.

Growth conditions of the plants

The plants grew in pots with 800 g of substrate. The substrate was a mixture of soil: sand in a 1:1 (v/v) ratio. The soil was steam-disinfested at 90 °C for 1 h for three consecutive days, while the sand was autoclaved twice for a period of 20 min at 120°C. Loamy soil was used with a percentage of sand, silt and clay of 38.30, 47.05 and 14.64, respectively. This soil had a percentage of organic matter = 0.83%, pH=8.5(1/2.5), total nitrogen, phosphorus and potassium available of 93, 10 and 110 ppm, respectively.

The plants had a ten-week growth period in a controlled greenhouse of the Experimental Station of Zaidín CSIC, Granada, Spain. For the first six weeks of growth the irrigation was the same for all treatments. From the sixth to the ninth week, all the plants were irrigated in the mornings according to the irrigation treatments (65 and 100 % of field capacity). The plants grew under a day/night cycle of 16/8 h, 21/15 °C with 50% of relative humidity. From the fourth week, all plants were fertilized (weekly 10 mL) with a dosage reduced to 50% of phosphorus from the Hewitt formula (Hewitt, 1966).

Measured variables

Photosynthetic efficiency (F_v / F_m) and stomatal conductance (Q_x)

The photosynthetic efficiency (F_v / F_m) was measuring by instrument FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic) was used, which permits a non-invasive estimation of the plant's photosynthetic through the fluorescence of chlorophyll a. The FluorPen quantifies the quantum performance of the photosystem II as the relationship between the real fluorescence performance in the state adapted to the light (F_v) and the maximum performance of fluorescence in the state adapted to the light (F_m) (Oxborough y Baker, 1997). To estimate the stomatal conductance, a porometer system (Porometer AP4, Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK) was used based on the manufacturer instructions.

To estimate the stomatal conductance and photosynthetic efficiency, half of the largest and healthiest leaf of each experimental unit was selected. Measurements were approximately taken at 10 a.m. (CEST- Central European Summer Time) on days with clear skies.

Biomass production

Only the fresh biomass of the roots, foliage and total plant was quantified since the rest of the vegetal material was used for estimating the physiological responses to water stress. The weights were taken with an Ohaus balance. Both roots and foliage was conserved at -20 ° Celsius until processing for the determination of physiological variables.

Oxidative damage in roots and foliage

To identify the oxidative damage in roots and foliage, the oxidative damage to the lipids (MDA in $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) and the hydrogen peroxide content (H_2O_2 in $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) were estimated. To estimate the content of lipid peroxides, 0.5 g of foliage and roots frozen with liquid nitrogen and 5 ml of trichloroacetic acid (TCA) at 5% were ground. The mixture was centrifuged at 12,290 g for 10 min. The chromogen was formed by mixing 0.5 ml supernatant at 0.5% (w/v) (TBA) and by incubating the mixture at 95°C for 30 min (Minotti y Aust, 1987). After cooling at room temperature, the absorbance was measured at 532 nm. The lipid peroxidation was estimated as the content of reactive substances to 2-thiobarbituric (TBARS) acid and expressed as the equivalents of malondialdehyde (MDA) according to Halliwell and Gutteridge (1985). The calibration curve was performed using MDA in the interval of 0.1-100 μmol . The blank for all the samples was prepared by replacing the sample with half the extraction.

The hydrogen peroxide content in foliage and roots was estimated through the method described by (Aroca et al., 2003). The following was pulverized in a mortar and mixed: 0.5 g of fresh weight of foliage and roots frozen with liquid nitrogen with 5 ml of TCA at 5% (w/v), 0.01 g of activated carbon and polyvinylpyrrolidone at 1% (w/v) (PVPP). The homogenate was centrifuged at 3070 g for 10 min. The supernatant was filtered through a Millipore filter (0.22 μm). Furthermore, 1 ml of 100 mM of buffer solution of potassium phosphate (pH 8.4) and 1 ml of colorimetric reagent at 100 μl of the supernatant were added. The colorimetric reagent was made by mixing 1:1 (v / v) 0.6 mM of potassium titanium oxylate and 0.6 mM 4-2 (2-Pyridylazo) resorcinol (disodium salt). The samples were incubated at 45°C for 1 h and the absorbance was at 508 nm. The calibration curve was

performed by using H₂O₂ in the interval of 50-1000 µmol. The blank was made by substituting the plant extract for 5% TCA.

Proline and glutathione content

The proline was extracted with a buffer solution of phosphate 100 mM (pH 7.8) from 0.5 g of foliage and roots frozen in liquid nitrogen. The proline was ascertained by spectrophotometric analysis at 520 nm using the ninhydrin reaction according to Bates et al. (1973).

To estimate the glutathione content in the roots and foliage, the method described by Smith (1985) was followed. A sample of 0.5 g homogenized and random from each treatment was ground in a mortar cooled with liquid nitrogen. To the extract, a aliquot of 5 ml of sulfosalicylic acid at 5% (p/v) was added, and the mix was filtered and centrifuged at 10.000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and mixed with 1.5 ml of buffer solution of K-phosphate 0.5 M (pH 7.5). The means of standard incubation was a mixture of the following: 0.5 ml of buffer of sodium phosphate 0.1 M (pH 7.5) with 5 mM EDTA, 0.2 ml 6 mM 5, 5'-dithiobis - (2-nitrobenzoic acid), 0.1 mL NADPH 2 mM and 0,1 mL (1 unit) of glutathione reductase. The reaction started through the addition of 0.1 ml of standard of glutathione or of extract. The absorbance measured at 412 nm and was expressed in nmol glutathione g⁻¹.

Estimation of the percentage of mycorrhizal colonization

The percentage of mycorrhizal colonization in roots was estimated in 2 g of fresh roots collected at random from each treatment. The roots were stained with the Phillips and Hayman method (1970), and the colonization was estimated with the technique described by Giovannetti and Mosse (1980).

Statistical analysis

For all the variables, the normality of the data was checked through a test of homogeneity and variances of Bartlett. A three-way ANOVA analysis was performed for all the response variables. Only for mycorrhizal colonization was a two-way. The differences between

treatments were determined by a LSD test. Both the ANOVA and the LSD were analyzed with a $p < 0.05$. The analyses were performed with Statgraphics Centurion XV.II. and the graphics were prepared with GraphPad Prism 5.

Results

The analysis of variance showed that the photosynthetic efficiency (Fv/Fm) varied significantly as a result of the double interactions of the cultivar-irrigation and cultivar-AMF factors. The stomatal conductance and the fresh weight of the foliage had significant effects by the interaction of the three factors (cultivar-irrigation-AMF). Finally, the fresh weight of the roots and the total dry weight varied significantly due to the interactions of cultivar-AMF and irrigation-AMF (Table 1).

Stomal conductance and photosynthesis

All the treatments irrigated at 100% of CC had a higher stomatal conductance than those treatments at 60 %. The native AMF only stimulated the stomatal conductance when inoculated in the Napízaro maize genotype, under irrigation conditions of 65 % of CC. In addition, this maize genotype also obtained the highest stomatal conductance when irrigated with 100%. The Mushito and hybrid genotypes inoculated with native AMF showered greater photosynthetic efficiency than Chalqueño, however, the Napízaro genotype had higher photosynthetic efficiency than the hybrid maize genotype with or without AMF (Figure 1a). For uninoculated plants, the hybrid genotype had significantly less photosynthetic efficiency (Figure 1b). Under 100%, all maize genotypes had similar photosynthetic efficiency. Moreover, the hybrid genotype was the most sensitive when grown under limited irrigation; however, irrigation had no effect on the reflectance of the Napízaro genotype (Figure 1c).

Plant growth responses

No plant growth pattern of the plant foliage was observed. However, the hybrid genotype plants grew less than the remaining maize genotypes in both irrigation conditions. Mushito and Chalqueño irrigated with 65 % CC showed similar biomass production, but the hybrid showed a growth stimulation when inoculated with AMF. When the plants were irrigated at

100 % CC, the accumulation of aerial biomass of the hybrid genotype and the Chalqueño genotype was favored by the inoculation of AMF, while the Mushito genotype had reduced growth (Figure a). The growth of the roots and the total plant biomass were similar in most treatments, but AMF inoculation only promoted root biomass of the hybrid genotype (Figure 2 b-c). Finally, all treatments showed increased foliage development compared to that achieved for roots. Furthermore, regardless AMF inoculation, significant differences were found between plants irrigated with 65% CC, though AMF plants had more foliage than roots (Figure 2 c).

Physiology as response to water stress

The analysis of variance did not show a general pattern for the effect of the factors (genotype, irrigation or AMF) on the physiological response of maize. The triple interaction significantly influenced the peroxide content in shoots and roots. The triple interaction also affected the glutathione contained in the roots, while in leaves it affected the oxidative damage to lipids and the proline content. The interaction AMF and maize genotype modified the proline content and oxidative damage to the lipids in roots and leaves, respectively (Table 2). The proline content in roots was also affected by the interaction between the cultivar and irrigation factors. Finally, the oxidative damage to lipids in the roots and the glutathione content in the foliage had a significant effect as a result of the independent factor of Irrigation or AMF inoculation (Table 2).

Oxidative damage to MDA lipids

The MDA content in the foliage was statistically similar in all the treatments irrigated at 65% of the CC. We observed that in the treatments irrigated at 100% of the CC, only the Texcoco maize registered a reduction of MDA in the foliage of the plants inoculated with AMF (Figure 3a). The MDA content in the roots was significantly higher in the plants irrigated at 100 % of the CC (Figure 3b), and the plants inoculated with AMF had significantly less MDA than the plants without inoculum (Figure 3c).

Glutathione

The glutathione content in the foliage was statistically when the treatments were irrigated at 100% of the CC (Figure 4a); however, the AMF promoted a greater concentration of glutathione in the foliage of the plants without the inoculum (Figure 4b). The three genotypes irrigated at 100% of the CC with and without native microorganisms statistically had the same quantity of glutathione in the roots in the presence or absence of AMF (Figure 4c). When the watering was limited, the AMF promoted a reduced synthesis of glutathione in the roots of the hybrid maize, while in the Napízaro maize they stimulated a greater accumulation of those carbohydrates. The glutathione in the roots of the Texcoco maize showed no significant differences before the inoculation AMF between both levels of irrigation (Figure 4c)

Proline

The inoculation of native AMF had no effect on the proline content in the foliage of any maize genotype under irrigation conditions of 100% of the CC. In general, the limitation of watering stimulated increased proline content in the foliage of the three maize genotypes. The hybrid maize reduced the synthesis of proline in the presence of AMF, while the proline content in the plant's foliage of the Napízaro genotype was disadvantaged by the presence of AMF. For their part, the presence or absence of AMF did not modify the proline content of the foliage of the Texcoco maize (Figure 5a). When the irrigation was limited, all genotypes had a higher proline content than when there was no watering limitation, but the hybrid maize statistically had the greatest proline accumulation in response to the watering limitation. The two native genotypes had similar proline contents. Finally, the proline content in the roots of the three genotypes irrigated at 100% of the CC was statistically similar (Figure 5b). Only the Napízaro genotype inoculated with native AMF obtained a greater synthesis of proline (Figure 5c)

Peroxides

Plants irrigated with 100 % CC had a similar production of hydrogen peroxide (H_2O_2) in foliage. AMF reduced the content of hydrogen peroxide in the hybrid genotype under limited irrigation; nevertheless, for Mushito and Chalqueño, the AMF inoculation increased the leaves oxidation (Figure 6a). In roots, a similar response was observed, where the AMF

inoculation lessened water stress in the hybrid genotype, while in the native of Napízaro the content of hydrogen peroxide in the roots was increased (Figure 6 b).

Mycorrhizal colonization

The AMF colonization increased in plants of the Mushito genotype grown under watering limitation; furthermore, this maize genotype showed the lowest colonization when plants were irrigated at 100% CC. For Chalqueño and hybrid maize genotypes, the AMF colonization did not vary between both irrigation treatments (Figure 7).

Discussion

The native AMF promoted physiological responses for lessening the effect of water deficit in the roots and foliage of maize plants. Results also showed that this contribution of AMF can vary between maize genotypes; in this sense, the hybrid genotype was more dependent on the mycorrhizal association than those criollo genotypes. Thus, the tested hypothesis is partially rejected since the physiological plant responses to water stress induced by AMF depend on the maize genotypes.

Soil fertility and water availability are the two most limiting environmental elements for the growth of cultivated and natural plants. The mycorrhizal symbiosis can be a strategy that allows reducing abiotic stress in plants (Smith and Smith, 2011). The present work provides more scientific evidence about the ability of native AMF for promoting plant physiological responses, such as the synthesis of metabolites, for reducing the negative impacts of drought in maize plants (Aroca et al., 2012). Nevertheless, it is recognized that the mycorrhizal establishment, compatibility and ecological interactions of AMF with plants are modified due to drought conditions (Johnson and Graham, 2013).

The present results partially concur with Armada et al. (2015) who reported that a consortium of native AMF reduce physiological and molecular indicators of maize plants under osmotic stress induced by drought as observed for the content of osmoprotectants in the hybrid genotype, but in general, the AMF inoculation stimulated the accumulation of osmotic stress indicators in the native maize genotypes. In this respect, some studies indicate the presence of a functional compatibility between maize genotypes and AMF that

determines the outcome of ecological interactions in both symbionts (Gavito and Varela, 1995; Klironomos, 2003; Johnson and Graham, 2013); thus, the mycorrhizal symbiosis is a continuum from mutualism to parasitism (Klironomos, 2003). Therefore, the growth and tolerance of water stress depends on the maize genotype, and moreover, on the compatibility between AMF and plants host and environmental stimuli (Kogel et al., 2006; Johnson and Graham, 2013).

It is important to consider that the microbial inoculum used in the present study, besides including AMF, also comprised other rhizosphere microorganisms. It is well-known that multiple plant-soil-microorganism interactions occur in the rhizosphere which modify the plant-AMF symbiosis (Lynch and de Leij, 2012). In addition, it has been proposed that AMF functionality depends on the presence of rhizobacteria (Frey-Klett et al., 2007). Armada et al. (2015) reported that the co-inoculation of native AMF with *Bacillus thuringiensis* had greater reduction of water stress symptoms when compared to the single inoculation. Conversely, the yeast inoculation may improve the P-uptake facilitated by the mycorrhizal mycelium in maize plants (Sarabia et al., 2017).

Other mechanism by reduce water stress in plants under is increase the root volume of the maize plants in order to extend the area of nutrient and water absorption (Calderón-Vázquez et al., 2009). Results showed that irrigation by itself did not stimulate the root volume, but the absence of AMF in the hybrid maize caused significant reduction of the root biomass. It is known that AMF stimulate changes in the root architecture under drought conditions; it is then probable that even though the plants developed the same root volume, the hybrid maize inoculated with AMF developed finer roots that permitted them to increase the surface of absorption of water through apoplastic or symplastic pathways (Aroca et al., 2012).

Photosynthetic efficiency and stomatal conductance are two physiological processes that directly influence the growth and development of mycorrhizal plants under water stress (Augé et al., 2014; Min et al., 2016). Only the genotype of Mushito showed an increase of stomatal conductance under conditions of water stress. In addition, water deficit had negative effects on the photosynthetic efficiency of the two native genotypes, but not by hybrid. This indicated that the effect of AMF was influenced by the mycorrhizal

compatibility with maize genotype, by which the hybrid genotype showed high mycorrhizal dependence for alleviating the osmotic stress, as discussed by Feddermann et al. (2010).

Studies have shown that maize plants synthesize metabolites such as sugars, antioxidants or amino acids to reduce the effects of water stress. In addition, different AMF species may also reduce the effect of drought in maize plants (Ruiz-Lozano, 2003; Armada et al., 2015; Bárzana et al., 2015; Quiroga et al., 2017). Results showed that the synthesis of hydrogen peroxide, MDA, glutathione and proline as water stress indicators vary not only on the AMF presence but between the osmolite studied and the analyzed foliage or roots. Thus, physiological responses of the maize plants depended not only on regimes of water limitation, but also on the double or triple interaction with the maize genotype and AMF inoculation.

The oxidative damage provoked by drought may be estimated by measuring the MDA and the hydrogen peroxide contents in plant tissues (Bienert et al., 2006; Anjum et al., 2016). In addition, the oxidative damage is a physiological factor that limits the growth and metabolic functions of plants; for example, it is known that the oxygen peroxides may oxidize photosynthetic systems, denature proteins and damage cell walls (Blokhina et al., 2003). Results showed that the MDA content in roots increased with limited irrigation, but the AMF protected the roots specifically of the hybrid genotype. On the contrary, the two native maize genotypes inoculated with AMF and grown under drought conditions revealed the highest levels of oxidative damage. In contrast, it has been proposed that AMF has the capacity to reduce oxidative damage in maize plant tissues (Armada et al., 2015; Quiroga et al., 2017). This discrepancy could be attributed to the fact that sensitive maize genotypes have greater dependence on AMF for regulating their physiological functions under water stress, while the native genotypes (criollos) could follow different response mechanisms like the synthesis of aquaporins that facilitate the solute and water transport in plant tissues (Chaumont et al., 2001). In this regard, aquaporin genes are activated under water stress conditions, but not all the genes are present in all races of maize and nor activated under water stress (Armada et al., 2015; Bárzana et al., 2015; Quiroga et al., 2017). This indicates that different maize genotypes can follow strategies for the alleviation of drought stress.

The environment and the plant genotype are elements that define the function of mycorrhizal symbiosis (Johnson and Graham, 2013; Klironomos, 2003). Both native maize genotypes showed increased proline and glutathione content in foliage and roots in the presence of AMF under limited irrigation conditions, but the mycorrhizal symbiosis reduced these contents for hybrid genotype under water stress. The former partially agrees with Quiroga et al. (2017), who reported that a drought-sensitive genotype of maize obtained greater benefits from mycorrhizal symbiosis than the tolerant variety. Similarly, Armada et al. (2015) reported that native AMF reduced the proline and glutathione content, and concluded that mycorrhizal maize plants suffered less water stress when grown in association with native AMF. This suggests that hybrid genotypes are more dependent on the AMF association than native genotypes as a functional strategy of osmotic adjustment in the presence of drought.

It has been proposed that AMF can play an important role in the development of systems of sustainable agricultural production (Gianinazzi et al., 2010; Gryndler et al., 2006). In addition, the present results show the importance of understanding not only at the microorganism-plant interaction level, but also at the community of rhizosphere microorganisms-maize genotype level (Larsen et al., 2015). It is known that hybrid genotypes sustain greater mycorrhizal colonization than native maize genotypes. Thus, the maize genotype and its origin are two of the elements that have great relevance in terms of mycorrhizal symbiosis establishment (An et al., 2010). Nevertheless, the mycorrhizal colonization showed differences between genotype and irrigation factors. In this way, the hybrid genotype had reduced AMF colonization as the stress alleviation increases; in contrast, the genotype from Napízaro showed an opposite pattern. This allows us to suppose that in addition to the influence of the maize genotype drought could be modifying element of the mycorrhizal interactions, and it is probable that the symbiosis is done more efficiently under stress conditions in hybrid genotypes.

It is important to consider that the agricultural soils contain native populations of AMF and other microorganisms, which can establish interactions between each other and develop individual emergent properties of each level of ecological organization (Johnson et al., 2006). The AMF species can differ in their effect at the level enter as interespecific;

furthermore, an AMF community with low taxonomic diversity does not imply that it has a low functional diversity (Munkvold et al., 2004). The former permits us to assume that a strategy that permits maintaining the performance of the crops under drought conditions is the development of strains that establish crop yield under drought condition. It is the development of strains that establish predominantly positive associations with maize to confront adverse environmental conditions (Chu et al., 2013). The native genotypes could be more vulnerable to drought conditions in the crop fields than the hybrid genotypes, in as much as the AMF interactions tend to establish parasitic relationships (Klironomos, 2003).

In conclusion, the AMF reduced the physiological responses of the hybrid maize genotype under drought conditions to keep similar response to well irrigated plants. Conversely, AMF inoculation resulted in increased production of osmoprotectant compounds in the two native maize genotypes.

Acknowledgements

We thank the postgraduate biological sciences program of the National Autonomous University of México for facilitating doctorate biological science training for the first author of this article. We also thank the National Council for Science and Technology (CONACYT) for funding the basic science project 179319.

Referencias

- Alvarado-Herrejón, M., Larsen, J., Gavito, M.E., Jaramillo-López, P.F., Vestberg, M., Martínez-Trujillo, M., Carreón-Abud, Y., 2018. Relation between arbuscular mycorrhizal fungi, root-lesion nematodes and soil characteristics in maize agroecosystems. *Appl. Soil Ecol.* <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2018.10.019>
- An, G.H., Kobayashi, S., Enoki, H., Sonobe, K., Muraki, M., Karasawa, T., Ezawa, T., 2010. How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasms. *Plant Soil* 327, 441–453. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0073-3>
- Anjum, S.A., Tanveer, M., Ashraf, U., Hussain, S., Shahzad, B., Khan, I., Wang, L., 2016. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 17132–17141. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6894-8>
- Armada, E., Azcón, R., López-Castillo, O.M., Calvo-Polanco, M., Ruiz-Lozano, J.M., 2015. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 90, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.004>
- Aroca, R., Irigoyen, J.J., Sanchez-Diaz, M., 2003. Drought enhances maize chilling tolerance. II. Photosynthetic traits and protective mechanisms against oxidative stress. *Physiol. Plant.* 117, 540–549. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00065.x>
- Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J.M., 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress

- conditions. *J. Exp. Bot.* 63, 43–57. <https://doi.org/10.1093/jxb/err266>
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2005.12.006>
- Augé, R.M., Toler, H.D., Saxton, A.M., 2014. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25, 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0585-4>
- Bárzana, G., Aroca, R., Ruiz-Lozano, J.M., 2015. Localized and non-localized effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on accumulation of osmolytes and aquaporins and on antioxidant systems in maize plants subjected to total or partial root drying. *Plant, Cell Environ.* 38, 1613–1627. <https://doi.org/10.1111/pce.12507>
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758, 994–1003. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2006.02.015>
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.* 91, 179–194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G., 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol.* 14, 89–97. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80929-2](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80929-2)
- Calderón-Vázquez, C., Alatorre-Cobos, F., Simpson-Williamson, J., Herrera-Estrella, L., 2009. Maize under phosphate limitation, en: *Handbook of maize: Its biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 381–404. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1_19
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M., Jung, R., 2001. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125, 1206–1215. <https://doi.org/doi:10.1104/pp.125.3.1206>
- Chu, Q., Wang, X., Yang, Y., Chen, F., Zhang, F., Feng, G., 2013. Mycorrhizal responsiveness of maize (*Zea mays* L.) genotypes as related to releasing date and available P content in soil. *Mycorrhiza* 23, 497–505. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0492-0>
- Elliott, J., Deryng, D., Müller, C., Frieler, K., Konzmann, M., Gerten, D., Glotter, M., Flörke, M., Wada, Y., Best, N., Eisner, S., Fekete, B.M., Folberth, C., Foster, I., Gosling, S.N., Haddeland, I., Khabarov, N., Ludwig, F., Masaki, Y., Olin, S., Rosenzweig, C., Ruane, A.C., Satoh, Y., Schmid, E., Stacke, T., Tang, Q., Wisser, D., 2014. Constraints and potentials of future irrigation water availability on agricultural production under climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 3239–3244. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222474110>
- Feddermann, N., Finlay, R., Boller, T., Elfstrand, M., 2010. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecol.* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.FUNECO.2009.07.003>
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka, M., 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176, 22–36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>
- Gavito, M.E., Varela, L., 1995. Response of “crillo” maize to single and mixed species inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi 76, 101–105. <https://doi.org/doi.org/10.1007/BF00017680>
- Gianinazzi, S., Golotte, A., Binet, M.N., van Tuinen, D., Redecker, D., Wipf, D., 2010. Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- Gryndler, M., Larsen, J., Hršelová, H., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., Kubát, J., 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0027-4>
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* 8, 89–193. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(85\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0098-2997(85)90001-9)
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell Environ.* 21, 535–553. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x>
- Johnson, N.C., Graham, J.H., 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1406-1>

- Johnson, N.C., Hoeksema, J.D., Bever, J.D., Chaudhary, V.B., Gehring, C., Klironomos, J.N., Koide, R.T., Miller, R.M., Moore, J., Moutoglis, P., Schwartz, M., Simard, S., Swenson, W., Umbanhowar, J., Wilson, G., Zabinski, C., 2006. From lilliput to brobdingnag: extending models of mycorrhizal function across scales. *Bioscience* 56, 889–900. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)56\[889:FLTBEM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)56[889:FLTBEM]2.0.CO;2)
- Johnson, N.C., Wilson, G.W.T., Wilson, J.A., Miller, R.M., Bowker, M.A., 2015. Mycorrhizal phenotypes and the law of the minimum. *New Phytol.* 205, 1473–1484. <https://doi.org/10.1111/nph.13172>
- Jones, P.G., Thornton, P.K., 2003. The potential impacts of climate change on maize production in Africa and Latin America in 2055. *Glob. Environ. Chang.* 13, 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0959-3780\(02\)00090-0](https://doi.org/10.1016/S0959-3780(02)00090-0)
- Klironomos, J.N., 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84, 2292–2301. <https://doi.org/10.1890/02-0413>
- Kogel, K.H., Franken, P., Hückelhoven, R., 2006. Endophyte or parasite - what decides? *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.001>
- Larsen, J., Jaramillo-Lopez, P., Najera-Rincon, M., Gonzalez-Esquivel, C.E., 2015. Biotic interactions in the rhizosphere in relation to plant and soil nutrient dynamics. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15, 449–463. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000039>
- Lynch, J.M., de Leij, F., 2012. *Rhizosphere*, eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000403.pub2>
- Min, H., Chen, C., Wei, S., Shang, X., Sun, M., Xia, R., Liu, X., Hao, D., Chen, H., Xie, Q., 2016. Identification of drought tolerant mechanisms in maize seedlings based on transcriptome analysis of recombination inbred lines. *Front. Plant Sci.* 7, 1080. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01080>
- Minotti, G., Aust, S., 1987. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 262, 1098–1104.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Morgan, J.M., 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 299–319. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001503>
- Munkvold, L., Kjølner, R., Vestberg, M., Rosendahl, S., Jakobsen, I., 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 164, 357–364. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x>
- Oxborough, K., Baker, N.R., 1997. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv/Fm- without measuring Fo-'. *Photosynth. Res.* 54, 135–142. <https://doi.org/10.1023/A:1005936823310>
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158–160. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Quiroga, G., Erice, G., Aroca, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J.M., 2017. Enhanced drought stress tolerance by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in a drought-sensitive maize cultivar is related to a broader and differential regulation of host plant aquaporins than in a drought-tolerant cultivar. *Front. Plant Sci.* 8, 1056. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01056>
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1312, 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
- Ruiz-Lozano, J., Porcel, R., Bárzana, G., Azcón, R., Aroca, R., 2012. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant drought tolerance: state of the art, en: Aroca R (Ed.), *Plant responses to drought stress*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 335–362. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_13
- Ruiz-Lozano, J.M., 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. *New perspectives for molecular studies. Mycorrhiza* 13, 309–317. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0237-6>
- Sanchez, G.J., Goodman, M.M., Stuber, C.W., 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Econ. Bot.* 54, 43–59. <https://doi.org/10.1007/BF02866599>
- Sarabia, M., Cornejo, P., Azcón, R., Carreón-Abud, Y., Larsen, J., 2017. Mineral phosphorus fertilization modulates interactions between maize, rhizosphere yeasts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Rhizosphere* 4, 89–93. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2017.09.001>
- Schmidhuber, J., Tubiello, F.N., 2007. Global food security under climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104,

- 19703–19708. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701976104>
- Smith, I.K., 1985. Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol.* 79, 1044–7. <https://doi.org/10.1104/PP.79.4.1044>
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., Shinozaki, K., 2010. “Omics” analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.006>
- Vörösmarty, C.J., Green, P., Salisbury, J., Lammers, R.B., 2000. Global water resources: vulnerability from climate change and population growth. *Science* (80-.). 289, 284–288. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.289.5477.284>

Table 1 ANOVA analysis for vegetable growth and photosynthesis variables of three maize races inoculum ted with native AMF and irrigated at 56 and 100% of CC estimated from n = 6. * p <0.05. Variables of photosynthesis were estimates before harvest

Factor	Shoot fresh	Root fresh	Total plant fresh	Photosynthetic efficiency	Stomatal conductance	AMF Root colonization
A: Race	*	0.2342	*	*	*	0.0914
B: Irrigation	*	*	*	*	*	0.2693
C: AMF	*	0.5031	*	*	*	---
Interactions						
A x B	*	0.9987	0.6581	*	0.5872	*
A x C	*	*	0.294	*	0.189	---
B x C	0.6319	0.661	*	0.4015	0.1388	---
A x B x C	*	0.3885	0.093	0.1748	*	---

Table 2 ANOVA of physiological responses variables to irrigation limitation of three maize races inoculum ted with native AMF and irrigated at 56 and 100% of CC estimated from n = 6. * p <0.05. Lipid peroxidation expressed as MDA (malondialdehyde) and peroxides. Metabolites of response to drought stress proline and glutathione

	Shoot				Root			
	MDA	Peroxides	Glutathione	Proline	MDA	Peroxides	Glutathione	Proline
A: Race	*	*	*	*	*	*	*	*
B: Irrigation	0.498	*	*	0.7854	*	0.7482	0.0716	0.0981
C: AMF	0.1776	*	0.5754	*	0.6133	*	*	0.0606
Interactions								
AB	0.7855	0.1966	0.8511	0.0769	0.7065	*	0.4053	*
AC	0.5748	*	0.1359	0.2615	0.6032	*	0.9233	*
BC	*	*	0.2795	*	0.1243	*	0.0515	0.7321
ABC	*	*	0.4148	*	0.1955	*	*	0.3312

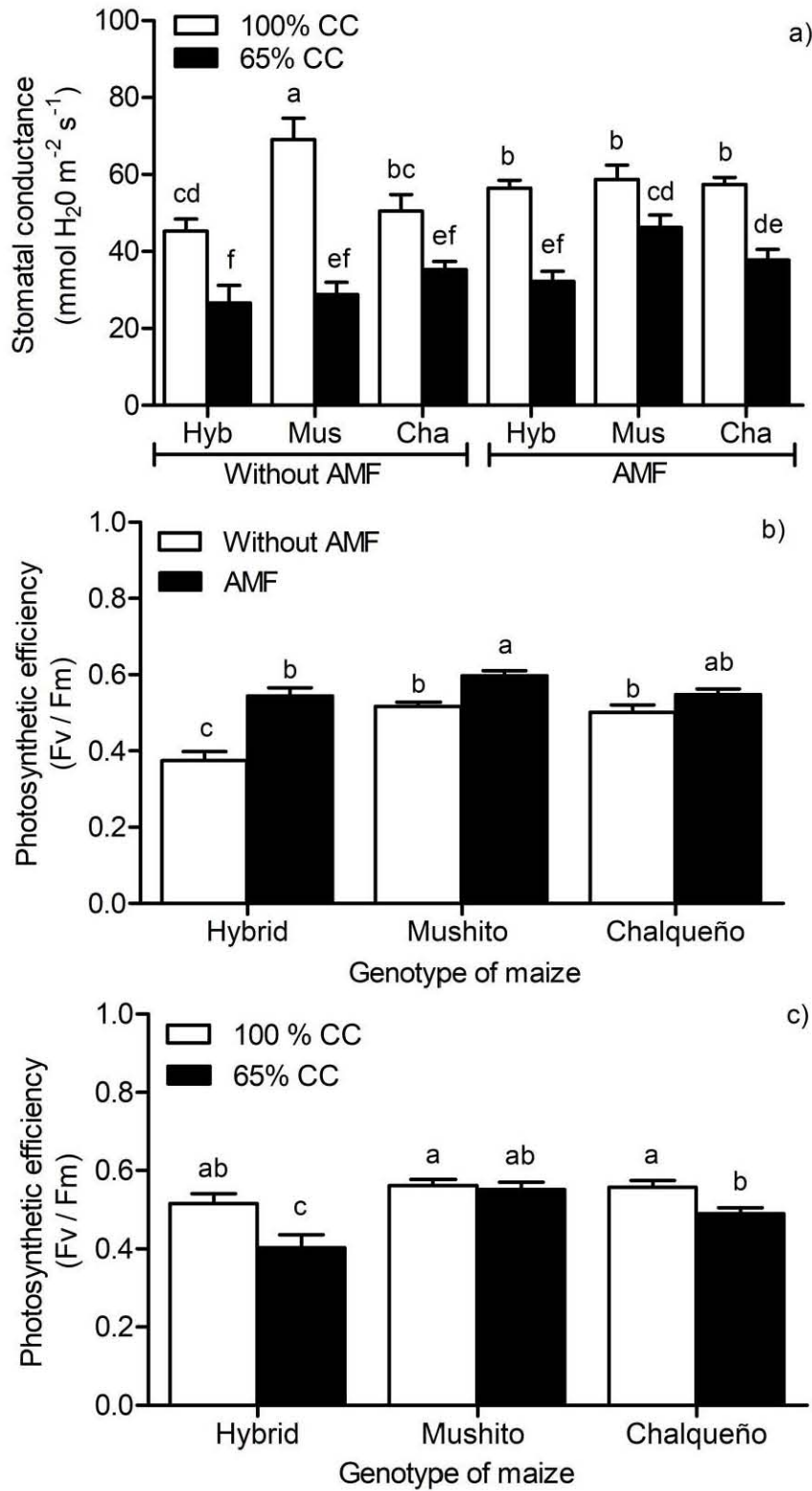


Figure 1. Effect of irrigation and inoculation of AMF on the stomatal conductance of three maize races (a); the interaction race of maize-HMA (b) and race of maize -irrigation (c) on the photosynthetic efficiency of the genotypes hybrid, Chalqueño and Mushito.

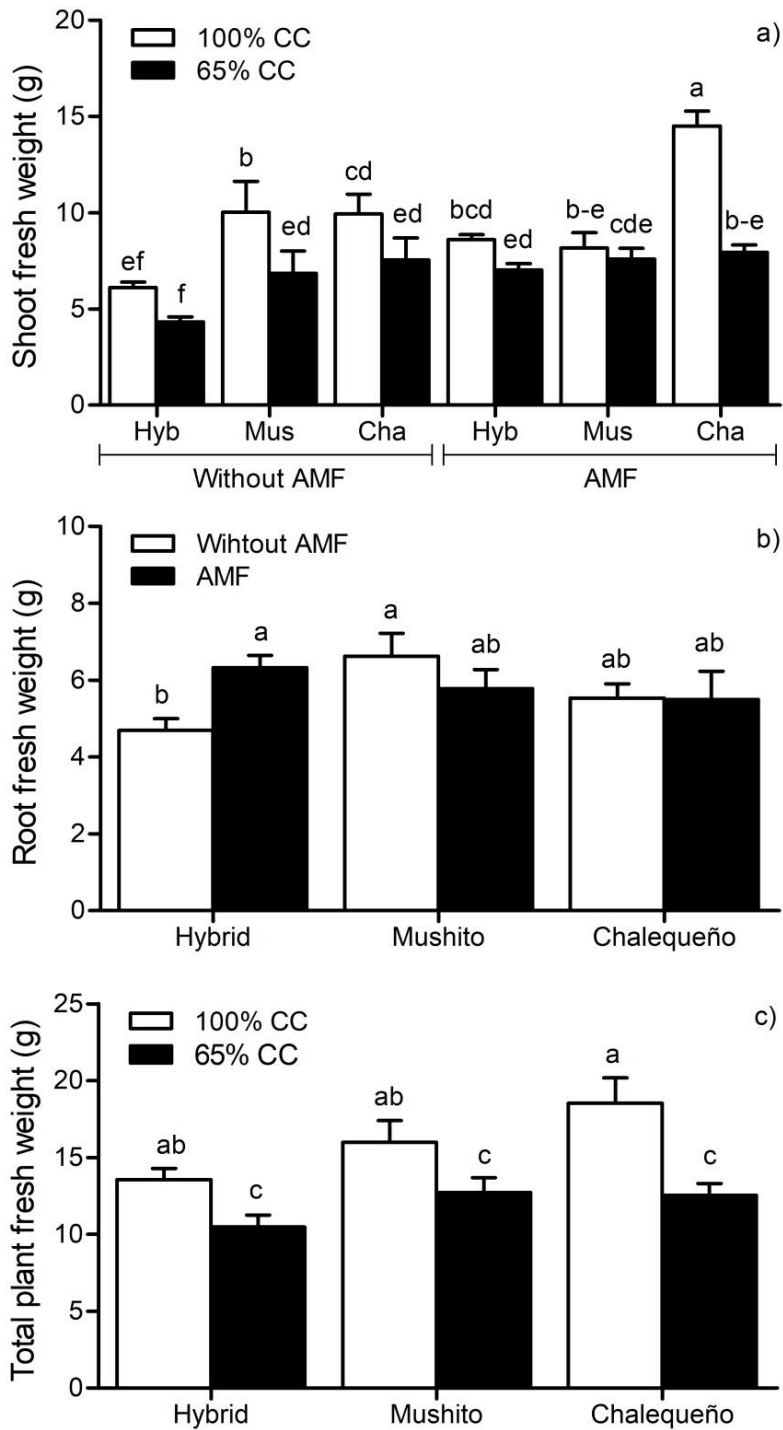


Figure 2 Plant growth variables of two genotypes of native and hybrid maize inoculated with native AMF and irrigated at 65 and 100% of the field capacity of the soil. a) shoot fresh weight b) root fresh weight c) total plant fresh weight. All of them show the estimated mean from $n = 6$ and an LSD test with $p < 0.05$.

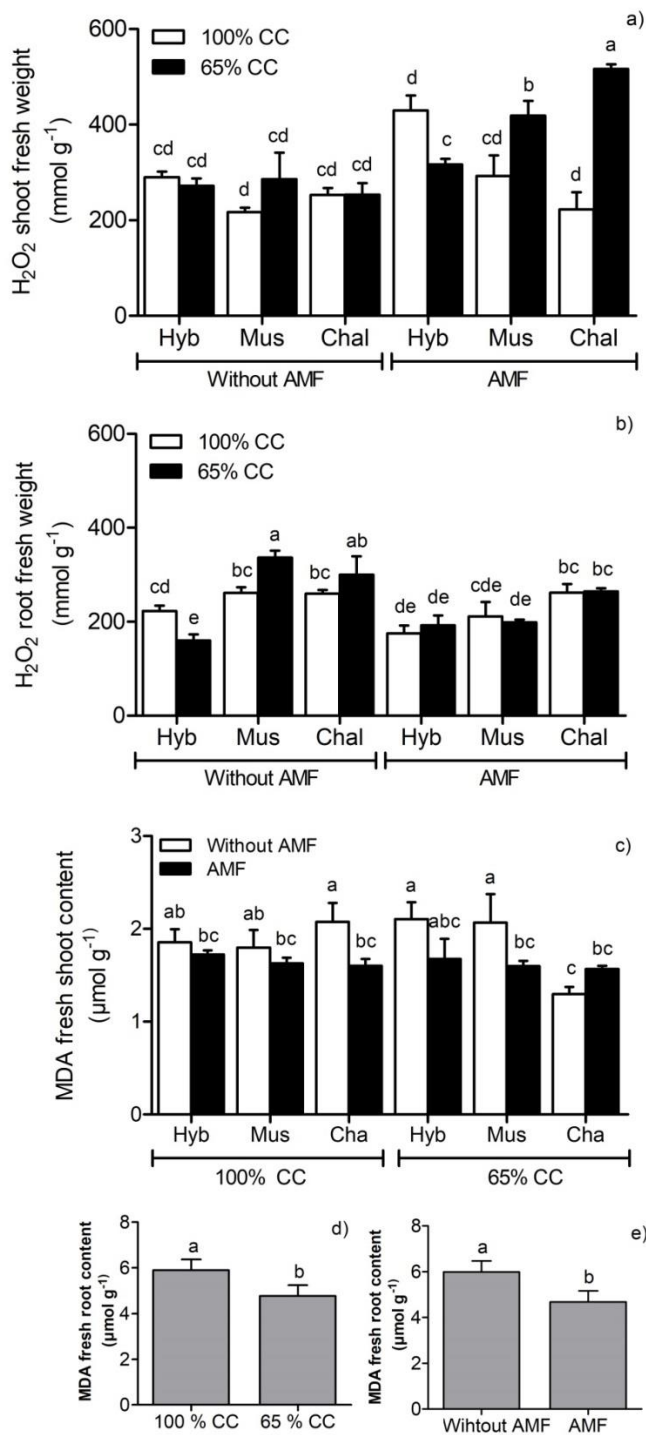


Figure 3 Oxidative damage to lipids estimated as peroxide content in shoot (a) roots (b) and MDA (malondialdehyde) in shoot (c) and roots (d, e) of three maize genotypes irrigated at 65 and 100% of CC and inoculated with native AMF. The genotypes of maize are identified as: Hib = hybrid, Mus = Mushito, Cha = Chalqueño. All the graphs were constructed from the ANOVA results and the average value is shown with standard error bars estimated from n = 3 and analyzed with an LSD test with p < 0.05.

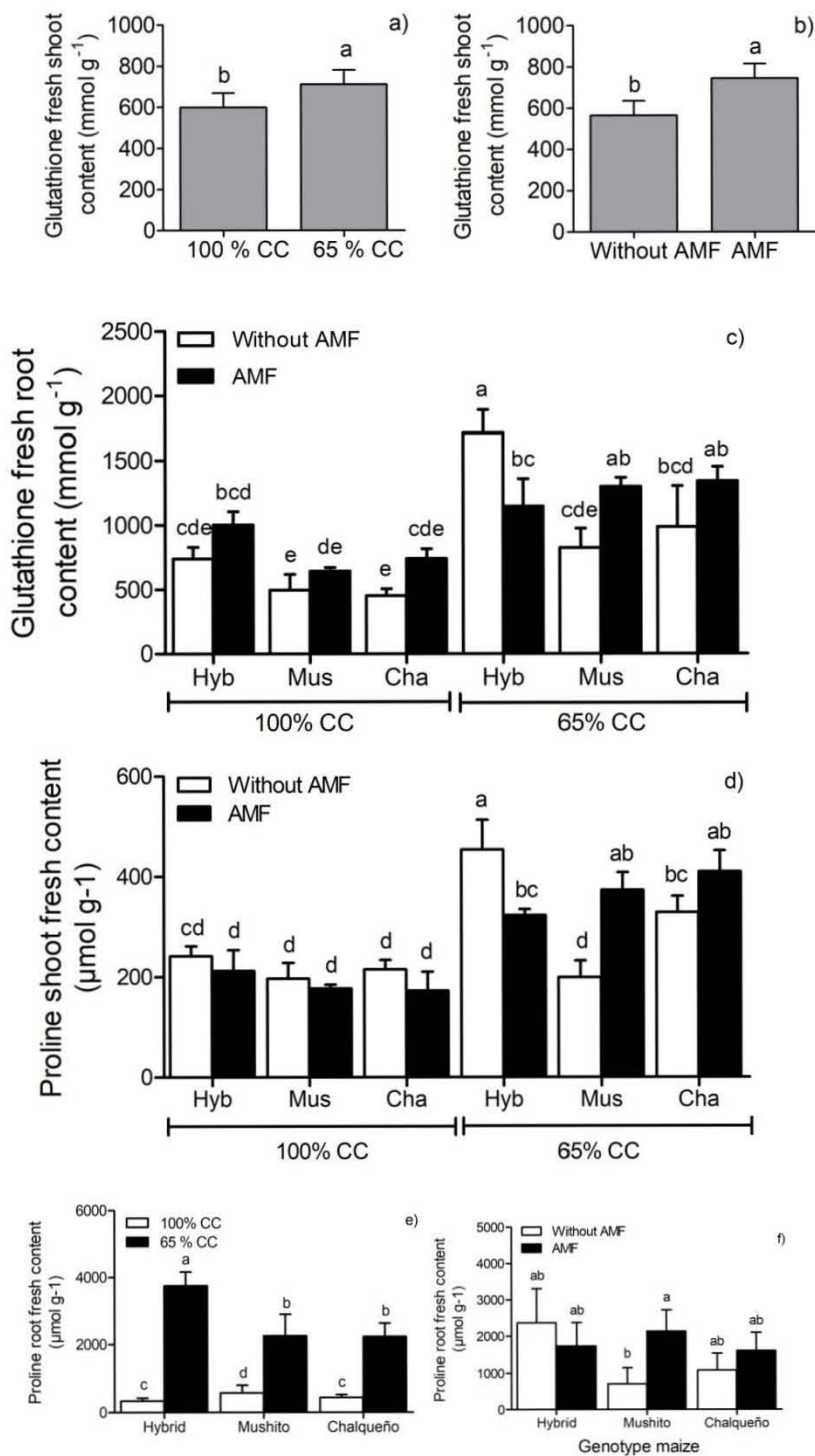


Figure 4 Metabolites of drought stress response estimated as glutathione content (mmol g^{-1}) in the shoot (a and b) and roots (c); and proline in shoot (d) and roots (e, f) of three genotypes of maize (Hib = hybrid, Mus = Mushito, Cha = Chalqueño) inoculum ted with native AMF and irrigated at 65 and 100% field capacity. All the graphs were constructed from the ANOVA results and the average value is shown with standard error bars estimated from $n = 3$ and analyzed with an LSD test with $p < 0.05$.

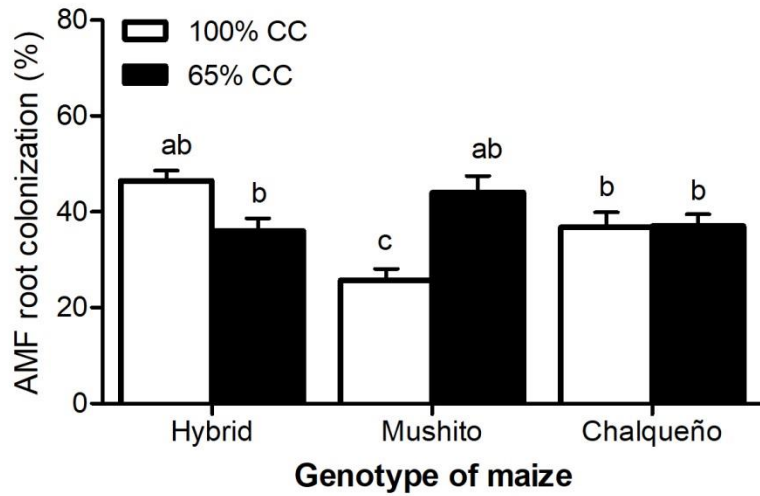


Figure 5 AMF roots colonization of three maize genotypes irrigated at 65 and 100% field capacity. The average value is shown with standard error bars estimated from $n = 6$ and analyzed with an LSD test with $p < 0.05$.

CAPÍTULO V

Capítulo 5. Importancia de los HMA nativos de un Vertisol en la producción y calidad del grano de tres genotipos de maíz



Importancia de los HMA nativos de un Vertisol en la producción y calidad del grano de tres genotipos de maíz

Resumen

La simbiosis micorrícica arbuscular ha sido descrita como una asociación mutualista entre las raíces de las plantas y los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). El efecto de la simbiosis micorrícica ha sido ampliamente estudiada bajo condiciones de invernadero, pero no existen estudios de la relación entre HMA nativos y el crecimiento y calidad de la semilla de maíz bajo condiciones de campo. Se llevó a cabo un experimento en condiciones de campo con tres factores: F1: tres genotipos de maíz: Ancho (nativo), H440 y Antílope (híbridos); factor 2: Fórmula de fertilización agronómica: control, NK (100-00-40) y NPK(100-60-40); y F3: HMA (con y sin aplicación de Benomyl). El experimento fue establecido en condiciones de temporal (junio-noviembre) en una parcela agrícola con un Vertisol y para controlar las poblaciones nativas de HMA se aplicó el fungicida Benomyl. Se estimaron pesos del follaje en tres etapas de crecimiento (V6, floración y senescencia) y la calidad de la semilla del maíz en términos de grasas, proteínas, fibras y carbohidratos. El porcentaje de colonización micorrícica disminuyó por efecto de Benomyl para las etapas V6 y floración de crecimiento. El efecto de la aplicación de Benomyl y la fertilización mineral en el crecimiento de las plantas varió con respecto a la etapa de desarrollo y al genotipo de maíz. La aplicación de Benomyl en los tratamientos fertilizados con NK promovió y redujo el crecimiento de los maíces Antílope y H440 respectivamente. La aplicación de Benomyl en ausencia de fertilización redujo el peso de las semillas de los tres genotipos de maíz. La aplicación de benomyl en ausencia de fertilización redujo el peso de las semillas de los tres genotipos de maíz, y redujo el contenido de grasas en el genotipo H440. Todos los genotipos de maíz mostraron menor contenido de proteínas cuando no se fertilizó. El benomyl incrementó y redujo la concentración de fibra en el genotipo Ancho y ambos híbridos respectivamente. El genotipo ancho acumuló mayor cantidad de carbohidratos que los genotipos híbridos. En conclusión, los HMA nativos de un suelo Vertisol pueden incrementar el rendimiento y calidad del grano de maíz, pero esta depende del genotipo de maíz, así mismo, la calidad de la semilla en términos de fibra es mayor para

los genotipos híbridos, mientras que el genotipo nativo tiene una mayor concentración de carbohidratos.

Palabras clave. Genotipos de maíz, Benomyl, calidad de la semilla.

Introducción

La simbiosis micorrícica tradicionalmente se ha definido como la asociación entre los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y las raíces de las plantas, en la cual ambos simbiontes tienen un beneficio mutuo. Los HMA son simbiontes obligados que adquieren de sus hospederos un nicho y una fuente de carbohidratos, mientras que las plantas obtienen nutrientes de los HMA, especialmente fósforo (Smith and Smith, 2011). Sin embargo, se ha puesto en evidencia que la simbiosis micorrícica es una interacción que puede establecerse en un continuo de interacciones ecológicas desde el mutualismo al parasitismo (Klironomos, 2003). En este sentido, el tipo de interacción que los HMA establecen con sus hospederos depende de la compatibilidad planta-microorganismo, de las condiciones específicas del ambiente y de la capacidad intrínseca de los HMA para colonizar las raíces y realizar desarrollar sus actividades funcionales en el suelo (Johnson and Graham, 2013). Así, el tipo de suelo y la disponibilidad de nutrientes pueden regular o modificar la interacción de los HMA con sus hospederos (Johnson et al., 2010). En este sentido, uno de los principales mecanismos que regulan la colonización micorrícica y su función, es la disponibilidad de fósforo en el suelo, donde a mayor disponibilidad de este elemento, menor colonización micorrícica (Treseder and Allen, 2002).

Por otro lado, se ha propuesto que existen mecanismos ambientales, como el tipo de suelo y la disponibilidad de nutrimentos , que pueden regular o modificar la interacción de los AMF con sus hospederos (Johnson et al., 2010). En este sentido, uno de los principales mecanismos que regulan la colonización micorrícica y su función, es la disponibilidad de fósforo en el suelo; de este modo, a mayor fósforo disponible menor colonización (Treseder y Allen, 2002).

The World Reference Base for Soil Resources (WRB) reconoce 32 grupos de suelo alrededor del mundo, y describe a los vertisoles como un suelos con buena fertilidad debido a su alto contenido de materia orgánica, aunque su alto porcentaje de arcillas puede dificultar la infiltración del agua y ocluir nutrientes como el fósforo (IUSS Working Group WRB, 2014). Por otro lado, los HMA inoculados en un suelo vertisol incrementaron la cantidad de agregados del suelo, los cuales dan estructura al suelo y son reservorios de nutrientes y agua (Bearden and Petersen, 2000). Lo anterior que permite suponer que la simbiosis micorrícica también puede jugar un papel importante en la productividad de maíz bajo condiciones de campo. Sin embargo, la mayoría de la información científica disponible se ha realizado en condiciones de invernadero o cámaras de crecimiento, donde generalmente se minimizan las presiones bióticas y abióticas sobre la funcionalidad de los HMA. Entonces, la experimentación en campo que valide la función de la simbiosis micorrícica bajo condiciones donde se produce el maíz, permitirá una valoración más certera y desarrollar prácticas de manejo para hacer más eficientes los agroecosistemas (Ryan and Graham, 2018).

Por su importancia cultural, su económica y la superficie de siembra, el maíz es uno de los cultivos más importantes del mundo. Existe una gran diversidad de cultivares que están adaptados a condiciones específicas de suelo, clima, tecnología y sistemas de producción (Ranum et al., 2014). México es el cuarto país productor de maíz en el mundo y cuenta con 59 razas de maíz clasificadas con base en atributos morfológicos e isoenzimáticos (Sanchez et al., 2000). Ahora bien, existen reportes, en su mayoría con experimentos en invernadero, que han obtenido resultados contrastantes del efecto de la simbiosis micorrícica en el crecimiento de diferentes genotipos de maíz. Por ejemplo, se ha propuesto que el mejoramiento del maíz no tienen efecto sobre la colonización de HMA; sin embargo, si existe una variación entre genotipos y el tiempo de cultivo del maíz híbrido (An et al., 2010). Además, la respuesta de maíces nativos (criollos) a la inoculación de HMA nativos fue similar al efecto de la cepas puras bajo condiciones de invernadero (Gavito and Varela, 1995). En ambas investigaciones no se evaluó la inoculación de los HMA en condiciones de campo ni en la calidad de la semilla. Por tanto, evaluó la hipótesis de que los HMA nativos de un suelo vertisol mejorarán el crecimiento y el rendimiento en términos de la calidad del grano de tres diferentes genotipos de maíz.

Métodos

Descripción del sitio

La parcela agrícola se localiza dentro de la cuenca del Lago de Cuitzeo, en la comunidad del Calvario, en el municipio de Álvaro Obregón, Michoacán, México (19°48'06.2"N, 101°03'28.5"W) a una altura de 1945 m. El clima es templado con lluvias en verano (Bravo-Espinosa et al., 2012). Con base en la descripción del perfil edafológico, el suelo como un Vertisol (IUSS Working Group WRB, 2014). Las propiedades de fertilidad del suelo se analizaron en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Se analizó el contenido de materia orgánica (1.9%) pH (8.05), N-inorgánico (39.5 ppm), P-Olsen (25.56 ppm) potasio (671.456 ppm), Ca (5,692.85), Mg (1,383.22), Na (887.58) y la capacidad de campo de 560.79 L m⁻². La parcela tiene al menos 15 años de producción continua de maíz de temporal.

Diseño experimental

Se desarrolló un diseño factorial con tres factores. El factor 1: genotipos de maíz (H440, Antílope y Ancho), factor 2: HMA (con y sin aplicación de Benomyl), factor 3: fertilización mineral [Control, NK (100-00-40) y NPK (100-60-40)]. En total se tuvieron 18 tratamientos con 4 repeticiones y 72 unidades experimentales. Cada unidad experimental tuvo 5 metros de largo con 4 surcos con una distancia de 0.8 m entre surcos. Las semillas se sembraron a una distancia de 0.2 m entre plantas. Solo en las plantas de los surcos centrales se realizaron los muestreos para los análisis, además, todas las plantas seleccionadas tuvieron competencia completa con las plantas aledañas. Los surcos laterales de cada unidad experimental sirvieron para amortiguar el efecto de borde entre unidades experimentales, pero todos los surcos de cada unidad experimental fueron manejados de acuerdo con el tratamiento correspondiente.

Manejo agronómico del cultivo

El experimento fue desarrollado en un sistema de cultivo de temporal (irrigado solo con agua de lluvia). El experimento se estableció el 4 de mayo del 2016 y la cosecha de maíz fue el 16 de diciembre del 2016. Se realizó un manejo integrado de plagas y arvenses compuesto por control manual y mecánico, así como un control químico (DENIM® 19 CE Benzoato de 4 “-epi-metilamino-4“-deoxiavermectina B1, B1a y B1b) en una dosis de 1 L/ha aplicado al follaje para el control de *Spodoptera frugiperda* e insectos de la familia Pyrgomorphidae en la etapa de crecimiento V7.

El fungicida Benomyl se ha utilizado en múltiples investigaciones en campo para eliminar o reducir la colonización de las poblaciones nativas de HMA a través de la reducción de la actividad enzimática (Larsen et al., 1996). Sin embargo, al no ser un fungicida específico también se ha visto que puede reducir la abundancia de poblaciones de otros microorganismos del microcosmos (Chen et al., 2001). Para el experimento se realizaron dos aplicaciones de 0.5 g de Benomyl [Methyl 1-(butylcarbamoil)-2-(benzimidazole) carbamate; C₁₄H₁₈N₄O₃ al 50% de la marca ADAMA] disueltos en 25 ml/planta. La primera aplicación se realizó al momento de la siembra y la segunda a los 30 días después de la germinación.

Se utilizó la fórmula agronómica de fertilización fue 100-60-40 de NPK para fertilización completa y de 100-00-40 para los tratamientos sin fósforo. Como fuente de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio (20.5-00-00), fosfato de amonio dibásico (16-46-00) como fuente de fósforo y cloruro de potasio (00 – 00 – 60) para el aporte de potasio. Toda la fertilización se aplicó al momento de la siembra.

Genotipos de maíz

Se evaluaron dos genotipos híbridos de maíz (H440 y Antílope) y un nativo (Ancho). El H440, es un maíz híbrido que alcanza la floración a los 70 días y se cosecha a los 120–125 días con una altura de 1.80 a 2.00 m. La mazorca es de forma cónica cilíndrica con 12 a 14 hileras y presenta características de resistencia a sequía. El maíz Antílope es un genotipo que desarrolla la floración entre los 90-105 días de crecimiento con una altura de 204 cm, la mazorca es cónica con 16 hileras por mazorca. Por su parte, el maíz ancho es un genotipo

nativo que se caracteriza por tener mazorcas semicilíndricas, con granos muy grandes y anchos en longitud (Sanchez et al., 2000).

Variables de respuesta

Variables de crecimiento. Se estimó el peso seco del follaje de las plantas de maíz en la etapa de crecimiento V6 (30 días después de germinación), en la floración (90 días después de germinación) y en la cosecha de maíz (120 días después de germinación). Las plantas completas fueron secadas en un horno de secado a 80 °C hasta obtener peso constante. Se estimó el peso del maíz en mazorca y en grano con una báscula Ohaus y se midió el largo y ancho de las mazorcas con un metro convencional. Para la estimación de estas variables se tomaron todas las mazorcas de 8 plantas con competencia completa con sus plantas de maíz aledañas. Los valores de cada mazorca fueron considerados como pseudoréplicas y promediados por unidad experimental.

Calidad de las semillas de maíz. También se determinaron los atributos de la calidad las semillas con base en su análisis bromatológico. Para tal fin, se maceró una muestra aleatorizada de los granos de 8 mazorcas por tratamiento. El contenido de proteína, fibra, grasas, cenizas carbohidratos y materia seca fueron estimados mediante los métodos descritos por la Association of Official Analytical Chemists (1990). La humedad de las semillas (%) y materia seca (%) se determinaron mediante la diferencia entre el peso húmedo y el peso seco del grano obtenido después 48 h de secado en horno a 70°C. Para estimar la proteína cruda (%) se utilizó el método de digestión y destilación de Kjeldahl. Se digirió 1 g de semilla molida con 10g de sulfato de potasio (K_2SO_4), 0.7g de óxido de mercurio (HgO) y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), se destiló y se tituló con una solución estándar de ácido clorhídrico (HCl). El contenido de fibra cruda (%) se determinó mediante la digestión con soluciones de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e hidróxido de sodio (NaOH), posteriormente se calcinó la muestra y por diferencias de pesos se obtuvo la concentración de fibras. El contenido de cenizas (%) fue estimado por medio de las diferencias de pesos de muestra calcinada de cada tratamiento. Las muestras se calcinaron en crisoles de porcelana en una mufla a 550 °C por 12 h. Las grasas (%) fueron extraídas

con éter de petróleo y evaluadas como el porcentaje del peso después de evaporar el solvente. El porcentaje de carbohidratos se determinó mediante la suma del contenido de humedad (%), contenido de proteína cruda (%), contenido de lípidos crudos (%), contenido de fibra cruda (%), contenido de ceniza (%) menos el 100%, el cual corresponde al total de la muestra (Helrich, 1990).

Colonización micorrícica. Para estimar el porcentaje de colonización de HMA en las raíces de las plantas de maíz, se colectó una muestra aleatoria de raíces finas. Cada muestra se cortó en fragmentos de 0.5 cm y se volvió a aleatorizar para tomar una submuestras de 2 g. Cada submuestra fue teñida con azul tripano al 0.05% por el método descrito por Phillips and Hayman (1970). La colonización de HMA se estimó con base en la evaluación de 100 segmentos de raíces de acuerdo con el método de la línea-intercepto descrito por Giovannetti and Mosse (1980). Se estimó el porcentaje general de colonización micorrícica solo para las etapas de crecimiento V6 y floración. Además, se cuantificaron otros microorganismos no micorrícicos presentes en las raíces de los maíces pero teñidos, estos fueron principalmente especies de los géneros: *Polymyxa*, *Phytophthora*, *Pythium*.

Estadística

Se realizaron un análisis de varianza de tres vías para los factores (ANOVA-trifactorial) 1) Genotipo de maíz, 2) HMA (con y sin Benomyl), 3) fertilización (control, NP y NPK) con una $p \leq 0.05$ con el software StatGraphics Centurion XV.II. Las gráficas fueron elaboradas con GraphPad Prism 5. Además, para cada variable se revisó la normalidad de los datos con un test de Bartlett. Para identificar los tratamientos estadísticamente diferentes se realizó una test de LSD ($p \leq 0.05$). Los porcentajes de colonización fueron transformados mediante arcsine y analizados por ANOVA.

Resultados

El análisis de varianza mostró un efecto significativo para la interacción de los tres factores (genotipo de maíz, fungicida y fertilización) para las variables de peso de mazorca, pero de las semilla, las relaciones planta:semilla y mazorca:semilla, extracto etéreo (grasa), proteína cruda, los pesos secos del follaje en la etapa de floración y senescencia, así como la colonización micorrícica estimada en la etapa V6 de crecimiento. . La interacción entre

genotipo de maíz x fertilización fue significativa para el ancho y largo de la mazorca, mientras que el efecto en el follaje en la etapa V6 de crecimiento, el largo de mazorca y el contenido de fibra cruda fue significativo para la interacción genotipo de maíz x fungicida. El ancho de la mazorca y el peso seco de follaje en la etapa V6 de crecimiento también fueron afectadas por la interacción fertilización x fungicida. El genotipo de maíz afectó la relación planta:mazorca y la concentración carbohidratos, mientras que la presencia de HMA y otros microorganismos asociados a las raíces solo fue modificada por la aplicación de fungicida (Cuadro 1).

Peso del follaje

El efecto de las pas poblaciones nativas de HMA en el peso seco del follaje varió en función de la etapa de crecimiento (V6, floración y senescencia), del genotipo de maíz y del nivel de fertilización. La aplicación de Benomyl tuvo un efecto significativo cuando estuvo en interacción con el genotipo de maíz y los fertilizantes (Cuadro 1). La aplicación de Benomyl redujo la biomasa del genotipo Antílope en la etapa V6 de crecimiento, mientras que el Ancho se benefició con la eliminación de los HMA en la misma etapa de crecimiento. Además, la aplicación de Benomyl redujo el follaje de todos los genotipos fertilizados con NK en la etapa V6 de crecimiento. En las etapas de floración y senescencia, el genotipo nativo no presentó diferencias entre los tratamientos con y sin HMA fertilizados con NPK (Fig. 1 a). Durante la etapa de floración, la aplicación de Benomyl en ambos genotipos híbridos fertilizados con NPK redujo el follaje de las plantas, en contraste, la ausencia de fertilización promovió mayor biomasa del maíz Antílope en ausencia de HMA. Por otra parte, ningún tratamiento modificó el patrón de crecimiento del maíz Ancho (Fig. 1 c). Se encontró un efecto contrastante en ambos genotipos híbridos fertilizados con NK, el Antílope tuvo mayor crecimiento en ausencia de HMA, mientras que el híbrido H440 incrementó su crecimiento cuando no se aplicó Benomyl. Por su parte, el nativo Ancho redujo su biomasa cuando se eliminaron los HMA y no se fertilizó (Fig. 1 d).

Características de mazorca y semilla

La interacción aplicación de benomyl x genotipo no afectó significativamente la longitud de la mazorca de ambos genotipos híbridos. Por su parte, el maíz nativo en ausencia de

HMA redujo la longitud de la mazorca]. Las mazorcas del maíz H440 fueron las más pequeñas (Fig. 2a). La fertilización solo estimuló la longitud y el diámetro de las mazorcas del genotipo Antílope (Fig. 2b y d), y únicamente la fertilización con NPK incrementó el diámetro de las mazorcas del Ancho. El diámetro de la mazorca no presentó variación entre los tratamientos con y sin benomyl de cada genotipo de maíz (Fig. 2c). Los mayores pesos de mazorca y semilla se encontraron en el genotipo Antílope, pero ambos tratamientos de fertilización fueron estadísticamente similares; además, la aplicación de benomyl no produjo ningún efecto. Así mismo, el maíz Antílope redujo el peso de las semillas cuando se limitó la colonización micorrícica y no se aplicó fertilización mineral (Fig. 2e y f).

Relaciones entre variables

El híbrido Antílope fue el único genotipo que acumuló mayor peso de mazorca que de follaje, por su parte, los genotipos H440 y Ancho presentaron mayor peso de follaje en la relación follaje:mazorca (Fig. 3a). En general, la aplicación de benomyl no modificó la relación follaje:semilla de los tres genotipos, pero fue posible observar que las plantas de maíz Ancho tuvieron mayor peso del follaje, mientras que el maíz Antílope registró los valores más equitativos (Fig. 3b). Los maíces Antílope y Ancho sin fertilización y con NK respectivamente, tuvieron mayor relación mazorca:semillas (Fig. 3c).

Análisis bromatológicos de las semillas

La aplicación de benomyl no tuvo ningún efecto en la acumulación de grasa en las semillas de los maíces Antílope y Ancho, por su parte, el híbrido H440 solo mostró un incremento de ácidos grasos cuando no se aplicó fertilización a las plantas pero con aplicación del fungicida (Fig. 4a). La proteína cruda se redujo en los tres genotipos con benomyl y sin fertilización. Sin embargo, el benomyl no tuvo ningún efecto cuando las plantas fueron fertilizadas (Fig. 4b). La aplicación de benomyl para inhibir la colonización micorrícica redujo la cantidad de fibra en las semillas de ambos genotipos híbridos, mientras que en el genotipo nativo (Ancho) se obtuvo un incremento del contenido de fibra (Fig. 4c). El genotipo Ancho acumuló mayor cantidad de carbohidratos con respecto a ambos genotipos híbridos. El benomyl también estimuló una mayor concentración de carbohidratos que las plantas sin la aplicación del fungicida (Fig. 4 d y e).

Colonización micorrícica

La aplicación de Benomyl redujo la colonización de HMA durante la etapa de crecimiento V6 de todos los genotipos y en todos los niveles de fertilización. Además, en los genotipos híbridos se observó una depresión de los HMA en las raíces cuando se fertilizó con NPK pero este efecto no fue observado en el maíz nativo (Fig 5 a). Benomyl también redujo el porcentaje de colonización de otros microorganismos patógenos en la etapa V6 (Fig 5 b). De igual modo, el Benomyl redujo la colonización de HMA en la etapa de floración (Fig 5 c). Pero la colonización de patógenos fue mermada por el Benomyl (Fig 5 d) y la fertilización con NPK (Fig 5 e).

Discusión

Los resultados indican que el aporte de los HMA nativos en el desarrollo, producción y calidad del grano de maíz depende de la etapa del crecimiento, de la fertilización mineral y del genotipo. Además, la simbiosis micorrícica puede comportarse como antagonista, mutualista o neutralista debido a que para algunas variables, como el peso seco del follaje en V6, los HMA tuvieron un efecto contrastante en los genotipos Ancho y Antílope. Ryan y Graham (2018) mencionaron que la contribución de los HMA nativos en el rendimiento de diferentes cultivos, incluyendo el maíz, bajo condiciones de campo, puede ser modificada por múltiples factores como las prácticas agrícolas (fertilización o la selección del genotipo), elementos del ambiente (temperatura, fertilidad del suelo, etc), la composición de HMA y sus interacciones con la comunidad de microorganismos rizosféricos.

El estudio del papel que tienen los HMA en la producción de maíz y en general de la agricultura en condiciones de campo, ha tenido limitantes como la obtención de tratamientos control que puedan mostrar con mayor precisión, el efecto de la simbiosis micorrícica (Lekberg y Helgason, 2018). Al respecto, múltiples experimentos en campo han incluido la manipulación de las poblaciones nativas de HMA mediante el uso de fungicidas, especialmente el Benomyl. Sin embargo, una de las principales limitaciones de esta práctica es que no es un fungicida selectivo, por lo que podría también modificar la composición de la comunidad de microorganismos nativos (Pedersen y Sylvia, 1997), en incluso puede no eliminar la actividad metabólica de los hongos dentro de las raíces (Larsen et al., 1996).

Los resultados mostraron que el Benomyl y la fertilización redujeron la colonización micorrícica en las raíces de los tres genotipos de maíz en las etapas V6 y floración. Pero también se observó que la colonización de otros microorganismos asociados las raíces, como *Pythium* o *Polymyxa*, se redujeron en presencia del fungicida. Además de reducir la densidad de la microbiota, el uso de Benomyl puede reducir diferentes procesos que están relacionados con la disponibilidad de nutrientes, como la mineralización de materia orgánica (Torstensson y Wessén, 1984). Por lo que es probable que algunos de los resultados atribuidos al uso de Benomyl en la estimulación del crecimiento del maíz pudieran estar influidos por efectos directos (como reducción de parasitismos) o indirectos (cambios en el pH o en la mineralización de la materia orgánica) (Welch et al., 2010). Sin embargo, es difícil valorar la magnitud del efecto del benomyl, debido a que para algunas variables, la presencia o ausencia de microorganismos promovió efectos contrastantes, como el peso de las semillas de los genotipos Ancho y Antílope. Lo anterior permite proponer que el benomyl es un elemento que permite evaluar como los HMA nativos de un suelo vertisol pueden modificar el desarrollo, producción y calidad del grano de maíz en condiciones de campo.

Por otro lado, es bien sabido que la aplicación de fósforo mineral puede reducir la colonización de los HMA nativos en campo (Deng et al., 2017). Este efecto fue observado durante la etapa V6, donde para ambos genotipos híbridos se incrementó el crecimiento, pero no para el Ancho. Esta reducción de la colonización micorrícica en las raíces ha sido explicada por un “trade-off” entre la limitación de los nutrientes disponibles para las plantas, principalmente nitrógeno y fósforo y la asignación de carbono que la planta ofrece a los HMA. De este modo, la limitación por fósforo para el crecimiento de los maíces podría deducirse por transporte micorrícico, pero este efecto depende de la capacidad de las plantas para asignar carbohidratos a la simbiosis micorrícica (Johnson y Graham, 2013). La reducción de microorganismos no micorrícicos en las raíces de los maíces fertilizados, se atribuyó a que un mejor estatus nutricional de las plantas, permite una mayor defensa vegetal contra patógenos (Gryndler et al., 2006).

La simbiosis micorrícica está influida por el efecto que ejerce el ambiente o las prácticas agrícolas sobre la compatibilidad funcional entre el genotipo de las plantas y de los HMA

(Johnson et al., 2006). Al respecto, existe información contrastante en cuanto al efecto del genotipo sobre el beneficio de la simbiosis micorrícica, por ejemplo (Gavito y Varela, 1995) Gavito y Varela (1995) los genotipos nativos pueden tener mayor beneficio de la simbiosis que los genotipos híbridos. Pero recientemente, se ha señalado que el nivel de domesticación o hibridación del maíz no necesariamente puede tener un papel importante en el efecto de los HMA en la nutrición y crecimiento del maíz (An et al., 2010). Por el contrario, se ha propuesto que el crecimiento de los HMA en el suelo y su capacidad para transportar fósforo podría ser un mecanismo clave para el cultivo del maíz bajo condiciones limitantes de fósforo (Sawers et al., 2017), pero el crecimiento de las hifas en el suelo no fue analizada en la presente investigación. No obstante, los resultados sugieren que el efecto del genotipo de maíz es una variable necesaria de considerar para obtener o predecir el posible beneficio de los HMA en sistemas de producción de maíz.

El maíz híbrido Antílope fue el único genotipo que incrementó el diámetro y longitud de la mazorca cuando se fertilizó con NK o con NPK. Además, ambos genotipos híbridos redujeron las dos variables más importantes del rendimiento (pesos de mazorca y de semillas) cuando se eliminaron los HMA (tratamientos con aplicación de Benomyl) en ausencia de fertilizante. Lo anterior permite suponer que los HMA nativos son importantes bajo condiciones limitantes de nutrientes en ambos genotipos híbridos. Al respecto Chu et al. (2013) mencionaron que el desarrollo de genotipos híbridos de maíz no necesariamente es un proceso que involucre la pérdida de compatibilidad entre los HMA nativos y las plantas de maíz. Por otro lado, se ha propuesto que la domesticación de los cultivos podría promover que la simbiosis micorrícica sea funcional solo bajo condiciones limitantes de P (Martín-Robles et al., 2018). La presente investigación aporta evidencia que sugiere que los maíces híbridos podrían beneficiarse más de la simbiosis micorrícica cuando el suelo no es fertilizado. Esto podría atribuirse a que los fitomejoradores deliberadamente seleccionan caracteres deseables, que confieren ventajas generalmente productivas o de resistencia a estrés con respecto a los ancestros nativos (Duvick, 2005) y en el caso de los maíces estudiados, son dos genotipos altamente productivos.

Entonces, la simbiosis micorrícica podría ser crítica cuando en el proceso de mejoramiento se pierden mecanismos de respuesta de las variedades mejoradas a diversas condiciones de

estrés, como la limitación de nutrientes. En concordancia, la ausencia de HMA incrementaron el rendimiento de maíz nativo (peso de semilla y mazorca) bajo condiciones de limitación de fósforo, pero cuando la fertilización incluyó NPK, la colonización micorrícica redujo su rendimiento. Estos resultados indican que la limitación de fósforo podría ser un regulador de las interacciones benéficas entre los HMA nativos y el rendimiento del maíz. Además, que la fertilización con NPK podría promover un cambio de interacciones de positivas a antagonistas entre la colonización micorrícica y el rendimiento de maíz bajo condiciones de campo en un Vertisol. Este efecto también se ha observado en el crecimiento de maíces bajo condiciones de invernadero (López-Carmona et al., 2019) y se ha atribuido a que la limitación por fósforo promueve el transporte de fósforo por los HMA, mientras que las plantas bien fertilizadas dependen menos de la simbiosis micorrícica para acceder a los nutrimentos del suelo (Johnson et al., 2015).

Se ha sugerido que los HMA nativos pueden incrementar tanto el rendimiento como el valor nutrimental de los granos de varias gramíneas, incluyendo maíz (Ferrol et al., 2016). Sin embargo, existen pocos reportes sobre la importancia de los HMA nativos en el rendimiento y la calidad nutrimental o biofortificación de los cultivos en agroecosistemas (Ryan y Graham, 2018). En la presente investigación, la calidad del grano de maíz se evaluó en términos de su concentración de proteínas, ácidos grasos, fibras y carbohidratos. Al respecto, se obtuvo una relación interesante entre las concentraciones de fibra y carbohidratos, ya que ambos genotipos híbridos incrementaron la concentración de fibras y redujeron la de carbohidratos en presencia de HMA; en contraste, el genotipo nativo mostró un efecto inverso es decir, más carbohidratos en ausencia de HMA. Si bien, la relación carbohidratos:fibras no ha sido reportada en la literatura, es posible suponer que esta relación está afectada por un “trade-off” de nutrimentos por carbohidratos entre los HMA y sus hospederos respectivamente (Smith y Read, 2008), dado que al reducir la colonización micorrícica los hospederos pueden asignar o distribuir los compuestos de carbono a la mazorca y/o semillas. Además, fue evidente el aumento en la concentración de carbohidratos en las semillas cuando los tratamientos incluyeron fungicida, aunque este efecto difirió entre genotipos híbridos y nativos. Entonces, cobra sentido que haya una reducción en la colonización micorrícica cuando hay una mayor acumulación de compuestos ricos en carbono en las semillas; sin embargo, es posible que estos se acumulen

de forma diferente entre genotipos nativos (carbohidratos) e híbridos (fibras o celulosa). Un efecto contrario fue reportado para el arroz, en donde se encontró un incremento del contenido de nitrógeno (proteínas) en las semillas, pero no la de carbono (Zhang et al., 2016). La diferencia podría ser atribuida, además de los cultivos evaluados y su compatibilidad hospedero-HMA (Johnson et al., 2006), además Zhang et al. (2016) evaluó la función de una cepa de *Rhizophagus intraradices* (HDSF5) en macetas bajo condiciones de campo.

Los tres maíces estudiados, presentaron menor contenido de proteínas cuando no se fertilizó y se aplicó fungicida, además la presencia de HMA nativos, solo redujo el contenido de ácidos grasos (extracto etéreo) del genotipo híbrido H440 cuando no hubo fertilización. Por lo tanto, el genotipo de maíz, la fertilización mineral y la presencia o ausencia de HMA son determinantes en la calidad del grano. Al-Karaki y Clark (1999) reportaron resultados similares para el trigo, donde el contenido de lípidos y proteínas fue influido por la simbiosis micorrícica, el genotipo de trigo y la fertilización mineral, sin embargo, estos resultados fueron obtenidos bajo condiciones de laboratorio.

En conclusión, los HMA nativos del Vertisol estudiado, desarrollaron interacciones micorrícicas mutualistas, neutrales y antagonistas con sus hospederos. Sin embargo, los efectos variaron con respecto al genotipo de maíz, la etapa de crecimiento, y la variable de respuesta evaluada sobre la calidad del grano. Además, la limitación de fósforo no fue el mejor indicador para predecir el efecto de la simbiosis micorrícica arbuscular, por lo que es necesario incrementar el conocimiento de la relación entre el contenido de nutrientes y las interacciones micorrícicas para incrementar la sustentabilidad de los agroecosistemas de maíz.

Agradecimientos

Agradecemos al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México quien otorgó el grado de Doctor en Ciencias Biológicas del primer autor. Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México a través del proyecto de ciencia básica 179319

Revisión de Literatura

- Al-Karaki, G.N., Clark, R.B., 1999. Mycorrhizal influence on protein and lipid of durum wheat grown at different soil phosphorus levels. *Mycorrhiza* 9, 97–101. <https://doi.org/10.1007/s005720050006>
- An, G.H., Kobayashi, S., Enoki, H., Sonobe, K., Muraki, M., Karasawa, T., Ezawa, T., 2010. How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasms. *Plant Soil* 327, 441–453. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0073-3>
- Chu, Q., Wang, X., Yang, Y., Chen, F., Zhang, F., Feng, G., 2013. Mycorrhizal responsiveness of maize (*Zea mays* L.) genotypes as related to releasing date and available P content in soil. *Mycorrhiza* 23, 497–505. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0492-0>
- Deng, Y., Feng, G., Chen, X., Zou, C., 2017. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization is considerable at optimal Olsen-P levels for maximized yields in an intensive wheat-maize cropping system. *F. Crop. Res.* 209, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2017.04.004>
- Duvick, D.N., 2005. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). *Adv. Agron.* 86, 83–145. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)86002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)86002-X)
- Ferrol, N., Tamayo, E., Vargas, P., 2016. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *J. Exp. Bot.* 67, 6253–6265. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw403>
- Gavito, M.E., Varela, L., 1995. Response of “cillo” maize to single and mixed species inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi 76, 101–105. <https://doi.org/doi.org/10.1007/BF00017680>
- Gryndler, M., Larsen, J., Hřselová, H., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., Kubát, J., 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0027-4>
- Johnson, N.C., Graham, J.H., 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant Soil.* <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1406-1>
- Johnson, N.C., Hoeksema, J.D., Bever, J.D., Chaudhary, V.B., Gehring, C., Klironomos, J.N., Koide, R.T., Miller, R.M., Moore, J., Moutoglis, P., Schwartz, M., Simard, S., Swenson, W., Umbanhowar, J., Wilson, G., Zabinski, C., 2006. From lilliput to brobdingnag: extending models of mycorrhizal function across scales. *Bioscience* 56, 889–900. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)56\[889:FLTBEM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)56[889:FLTBEM]2.0.CO;2)
- Johnson, N.C., Wilson, G.W.T., Wilson, J.A., Miller, R.M., Bowker, M.A., 2015. Mycorrhizal phenotypes and the law of the minimum. *New Phytol.* 205, 1473–1484. <https://doi.org/10.1111/nph.13172>
- Larsen, J., Thingstrup, I., Jakobsen, I., Rosendahl, S., 1996. Benomyl inhibits phosphorus transport but not fungal alkaline phosphatase activity in a *Glomus*-cucumber symbiosis. *New Phytol.* 132, 127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04518.x>
- Lekberg, Y., Helgason, T., 2018. In situ mycorrhizal function - knowledge gaps and future directions. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.15064>
- López-Carmona, D.A., Alarcón, A., Martínez-Romero, E., Peña-Cabriales, J.J., Larsen, J., 2019. Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios. *Rhizosphere* 9, 38–46. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2018.11.004>
- Martín-Robles, N., Lehmann, A., Seco, E., Aroca, R., Rillig, M.C., Milla, R., 2018. Impacts of domestication on the arbuscular mycorrhizal symbiosis of 27 crop species. *New Phytol.* 218, 322–334. <https://doi.org/10.1111/nph.14962>
- Pedersen, C.T., Sylvia, D.M., 1997. Limitations to using benomyl in evaluating mycorrhizal functioning. *Biol. Fertil. Soils* 25, 163–168. <https://doi.org/10.1007/s003740050298>
- Ryan, M.H., Graham, J.H., 2018. Little evidence that farmers should consider abundance or diversity of arbuscular mycorrhizal fungi when managing crops. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.15308>
- Sawers, R.J.H., Svane, S.F., Quan, C., Grønlund, M., Wozniak, B., Gebreelassie, M.N., González-Muñoz, E., Chávez Montes, R.A., Baxter, I., Goudet, J., Jakobsen, I., Paszkowski, U., 2017. Phosphorus acquisition efficiency in arbuscular mycorrhizal maize is correlated with the abundance of root-external hyphae and the accumulation of transcripts encoding PHT1 phosphate transporters. *New Phytol.* 214, 632–643. <https://doi.org/10.1111/nph.14403>
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd ed. Academic Press.
- Torstensson, L., Wessén, B., 1984. Interactions between the fungicide benomyl and soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 16, 445–452. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(84)90050-6)
- Welch, M., Ravnskov, S., Kieliszewska-Rokicka, B., Larsen, J., 2010. Suppression of other soil microorganisms by mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in root-free soil. *Soil Biol. Biochem.* 42,

Cuadro 1 Valores de *p* ANOVA para el análisis del efecto de los factores genotipo de maíz, fertilización y benomyl en las variables del crecimiento de maíz en tres tiempos y caracterización de la mazorca a partir de $n=4$ y una $p<0.05$.

	Follaje			Frutos o mazorcas						
	V6	Floración	Senescencia	Largo	Ancho	Mazorca	Grano	Planta: Mazorca	Planta/grano	Mazorca / grano
Genotipo de maíz (G)	0.0111	0.5372	***	***	***	***	***	***	***	0.0397
Fertilización (F)	0.2993	0.3787	*	***	***	***	***	0.6791	0.139	0.1474
Benomyl (B)	0.9643	**	0.213	**	**	0.1215	***	0.47	0.8464	0.1424
G × F	0.69	**	0.5278	**	*	**	***	0.4898	*	0.0629
G × B	***	0.0645	*	**	0.08	0.4265	0.6726	0.1591	0.2234	0.1753
F × B	*	***	0.1434	0.4412	***	*	***	0.9154	0.468	0.1803
G × F × B	0.1489	***	**	0.1726	0.1468	*	***	0.1445	0.0512	***

* ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.01 ; *** ≤ 0.001

Cuadro 2 . Valores de *p* ANOVA para el análisis de los factores genotipo de maíz, fertilización y benomyl para las variables de la calidad del grano estimadas a partir de $n=4$ ($p<0.05$).

	Humedad (%)	Materia seca (%)	Extracto					Carbohidratos (%)
			etéreo (grasas %)	Fibra cruda (%)	Proteína cruda (%)	Cenizas (%)		
Genotipo de maíz (G)	0.9357	0.9357	***	0.9603	0.0946	*	*	
Fertilización (F)	0.8429	0.8429	0.1238	0.8767	*	0.284	0.0745	
Benomyl (B)	0.4743	0.4743	0.1531	0.4678	***	0.0534	*	
G × F	0.4212	0.4212	0.2084	0.51	*	*	0.306	
G × B	0.8604	0.8604	0.9844	*	0.4166	0.659	0.3414	
F × B	0.3566	0.3566	0.6089	0.147	***	0.9904	0.574	
G × F × B	0.7982	0.7982	*	0.7023	**	0.8384	0.0969	

* ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.01 ; *** ≤ 0.001

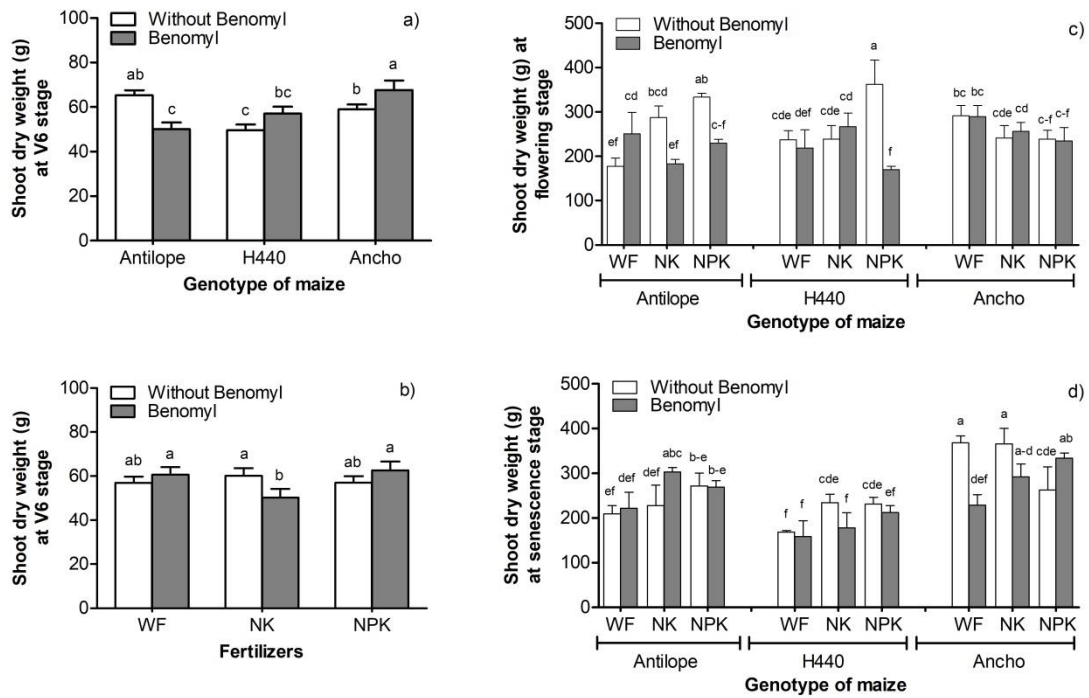


Figura 1 Peso seco del follaje de tres genotipos de maíz (Antílope, H440 y Ancho) para las etapas de crecimiento V6 (a, b), floración (c) y senescencia (d), cultivado en un Vertisol bajo condiciones de campo. La colonización micorrícica arbuscular fue controlada con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p < 0.05$

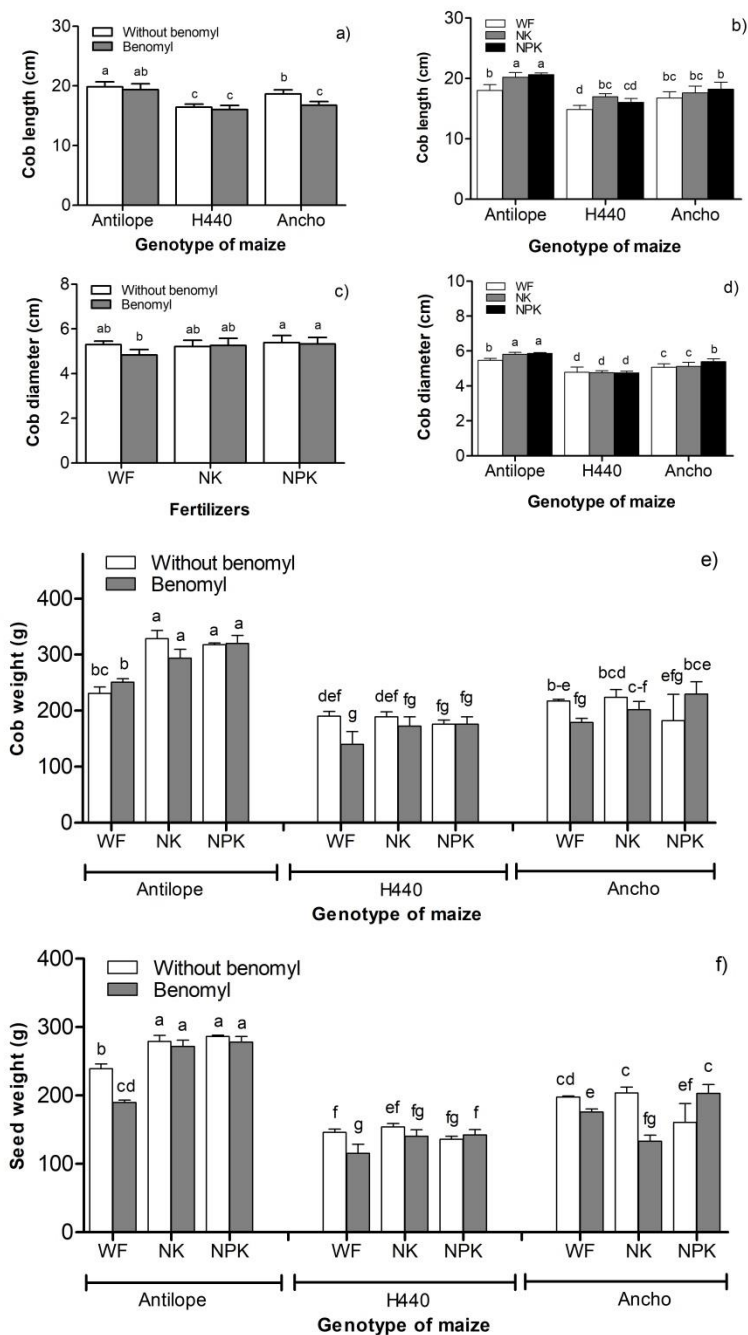


Figura 2 Largo (a, b), diámetro (c, d) y pesos de mazorca (e) y semillas (f) de tres genotipos de maíz (Antilope, H440 y Ancho), cultivado en un Vertisol bajo condiciones de campo. La colonización micorrícica arbuscular fue controlada con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p < 0.05$

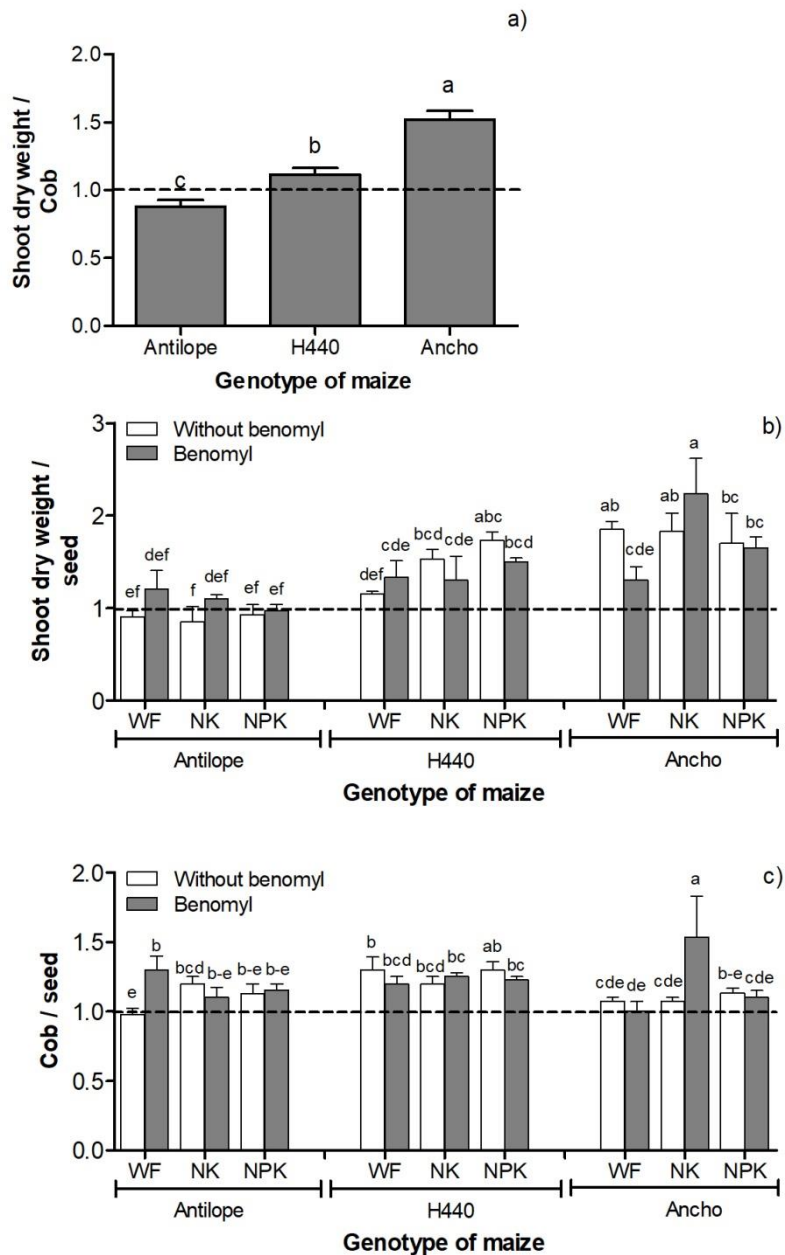


Figura 3 Relación entre peso seco del follaje en senescencia: peso de mazorca (a) peso seco del follaje en senescencia: peso de semillas (b) y peso de mazorca: peso de semillas (c) de tres genotipos de maíz (Antílope, H440 y Ancho) cultivados en un Vertisol bajo condiciones de campo. La colonización micorrícica fue controlada con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p < 0.05$

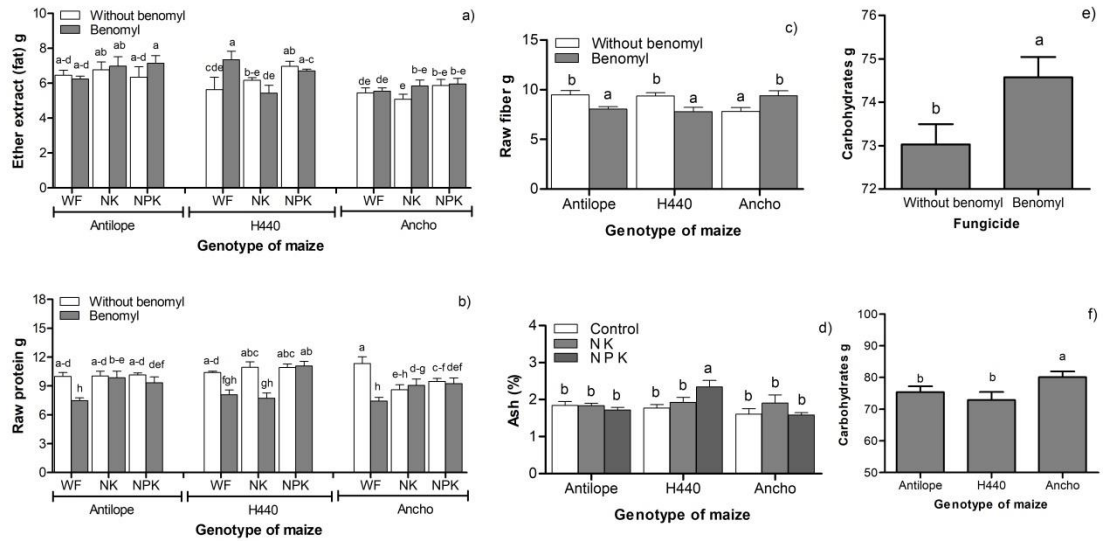


Figura 4 Calidad de la semilla de tres genotipos de maíz (Antilope, H440 y Ancho). Concentración de grasas (a), proteína (b), fibra (c), cenizas (d) y carbohidratos (e, f). La colonización micorrícica arbuscular fue controlada con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p < 0.05$

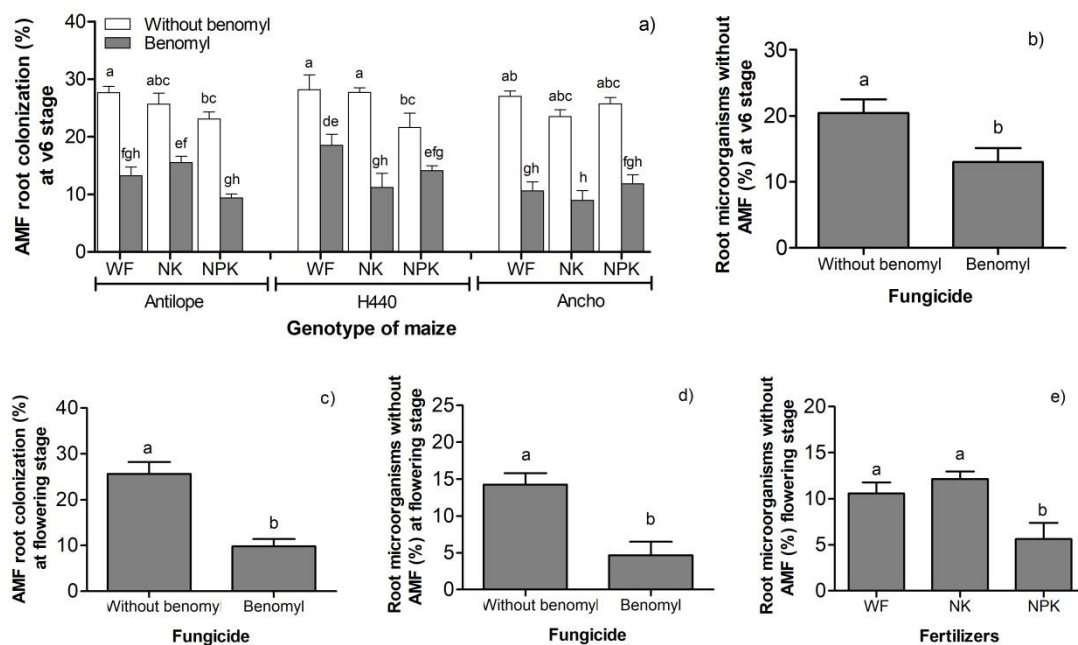


Figura 5 Porcentaje de colonización micorrícica arbuscular en las raíces de las plantas de tres genotipos de maíz las etapas de crecimiento V6 (a) y floración (c). Colonización de otros microorganismos no micorrícicos en las etapas de crecimiento V6 (b) y floración (d, e). La colonización micorrícica fue suprimida con aplicación de benomyl. Los tratamientos de fertilización se muestran como: WF, NK y NPK para el tratamiento sin fertilización, fertilización con nitrógeno-potasio y nitrógeno-fósforo-potasio respectivamente. Las barras representan el promedio (n=4) error estándar y un test de LSD $p < 0.05$

CAPÍTULO V

Capítulo 6. Discusión y conclusiones generales



Discusión general

La simbiosis micorrícica arbuscular es quizá, la interacción planta-microorganismo más importante, se establece entre las raíces de la mayoría de las plantas vasculares y los hongos micorrícicos arbusculares (Smith y Read, 2008). El estudio de las simbiosis micorrícica arbuscular podría permitir el desarrollo de prácticas de manejo con el fin de incrementar la sustentabilidad de los sistemas agrícolas (Gianinazzi et al., 2010). Sin embargo, la mayoría de información científica se ha generado a nivel de laboratorio, donde generalmente se busca simplificar el sistema de estudio planta-microorganismo-ambiente bajo condiciones controladas. Además, en los sistemas agrícolas se desarrollan complejas redes de interacciones multitróficas (plantas, macro, micro y meso fauna del suelo, etc.) y ambientales (temperatura, humedad, precipitación, etc.), que podrían influir en la simbiosis micorrícica y por ende, no necesariamente existe un vínculo entre las aproximaciones en laboratorio y los sistemas de producción de alimentos en campo (Ryan y Graham, 2018). En México, se ha propuesto que la simbiosis micorrícica arbuscular en sistemas de producción agrícola es un mecanismo para mejorar la nutrición de los cultivos principalmente de los productores de subsistencia (Montaño et al., 2012), sin embargo, es necesario ampliar el conocimiento en función del tipo de suelo, condiciones climáticas y tecnología de producción.

En este contexto, la presente investigación se enfocó al análisis de las interacciones entre diferentes genotipos de maíz y los HMA nativos de diferentes agroecosistemas. Se realizaron experimentos en laboratorio y en campo. Específicamente se profundizó en el análisis del efecto de las poblaciones nativas de HMA bajo la influencia de las prácticas de manejo agrícola más usadas: la fertilización mineral (Capítulos 2, 3 y 5), la selección del genotipo de maíz (Capítulos 3-5) y la irrigación (Capítulo 4). Con base en ello se analizó la siguiente hipótesis: El efecto de las poblaciones nativas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la estimulación del crecimiento, la productividad, la calidad de la semilla y el amortiguamiento del estrés hídrico en maíz dependerán de: 1) **Genotipo de maíz**: las variedades híbridas dependerá más de la simbiosis micorrícica para adquirir fósforo y reducir el estrés hídrico que los genotipos nativos. 2) **Fertilización mineral**: Los HMA nativos estimularán un mayor crecimiento del maíz cuando la fertilización no incluya

fósforo mineral. 3) **El grupo de suelo:** los HMA nativos estimularán un mayor crecimiento del maíz en suelos limitantes de fósforo.

Fertilización mineral

Es aceptado que la concentración de fósforo en el suelo puede inhibir la capacidad de los HMA para colonizar las raíces de las plantas y por ende, en las funciones que establece con sus hospederos (Treseder y Allen, 2002). Además, la composición de la comunidad de microorganismos rizosféricos puede estar influida por la aplicación de fertilizantes minerales u orgánicos (Gryndler et al., 2006). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el nitrógeno también puede tener un papel incluso más importante que el del fósforo en la regulación de las interacciones micorrícicas (Johnson et al., 2015). Esto implica que la simbiosis micorrícica no necesariamente sea unidireccional, es decir, puede ir en un continuo del mutualismo al parasitismo dependiendo de las condiciones ambientales en que se desarrolle (Johnson et al., 1997; Johnson y Graham, 2013). Los resultados obtenidos mostraron que la aplicación de fertilizantes fosfatados y nitrogenados puede modificar las interacciones micorrícicas y al respecto, se encontró que: 1) No todas las comunidades de HMA tienen la misma capacidad de promover el crecimiento de las plantas, 2) Las comunidades estudiadas pueden reducir la deficiencia de fósforo, pero no la de nitrógeno y 3) La formulación de la fertilización mineral (N, P o NP) puede modificar las interacciones entre los HMA nativos y las plantas de maíz. En este sentido, el nitrógeno puede tener mayor influencia en las interacciones micorrícicas, dado que este nutrimento limita la fotosíntesis y por tanto la asignación de carbohidratos a la simbiosis micorrícica; mientras que la limitación de fósforo para el crecimiento de las plantas puede ser reducida por el micelio micorrícico (Johnson et al., 2015). Cuando el suelo tiene concentraciones bajas de nitrógeno o fósforo, las plantas y los HMA pueden competir por su absorción y asimilación, y a su vez, promover que las interacciones micorrícicas sean antagónicas (Jones et al., 2018; Xin-Xin et al., 2018). Sin embargo, recientemente se ha puesto en evidencia que el maíz nativo podría establecer simbiosis con bacterias diazotróficas para la fijación de nitrógeno a través del mucilago de las raíces aéreas y con ello, la competencia por el nitrógeno del suelo con la microbiota podría reducirse considerablemente (Van

Deynze et al., 2018). Por otro lado, la promoción del crecimiento de las plantas de maíz también puede estar relacionada con su capacidad para promover el crecimiento del micelio micorrícico, con el potencial de los HMA para sintetizar transportadores específicos de nutrientes y con el proceso de domesticación asociado a su vez con los regímenes de fertilización fosforada (Lanfranco et al., 2018).

También se evaluó si los HMA nativos de tres suelos (Vertisol, Andosol y Luvisol) pueden reducir la deficiencia de fósforo cuando son inoculados en su suelo de origen y en los suelos exóticos. Se encontró que: 1) En todos los suelos, cuando la fertilización no incluyó fósforo, las comunidades de HMA nativos promovieron el crecimiento de las plantas de maíz, y 2) La mayor estimulación del crecimiento de las plantas de maíz fue observada en el suelo que naturalmente contuvo la menor cantidad de fósforo (Andosol). Las diferencias en crecimiento obtenidas no pudieron ser atribuidas al contenido de nitrógeno del suelo, puesto que todos los suelos presentaron una concentración similar. Entonces, los resultados fueron atribuidos a la facilitación de fósforo por el micelio micorrícico (Smith y Smith, 2011). Sin embargo, los resultados del punto 1) no ratificaron lo publicado por Ji et al., (2013), quienes propusieron que los HMA nativos tienen mayor capacidad de estimular el crecimiento de sus hospederos cuando son inoculados en su suelo de origen, en comparación con suelos exóticos. Esta discrepancia fue atribuida a que las prácticas de fertilización ejercen una presión de selección sobre las poblaciones de HMA nativas y en general, sobre los microorganismos rizosféricos, por lo tanto, es probable que la comunidad microbiana esté adaptada a las prácticas de fertilización (Ma et al., 2018).

En ambos experimentos fue posible observar que tanto el nitrógeno como el fósforo son elementos que influyen en la simbiosis micorrícica. En este sentido, el balance estequiométrico C:N:P podría ser crítico para comprender como la disponibilidad de nutrimentos puede regular las interacciones micorrícicas (Johnson et al., 2010). Así mismo, la disponibilidad de nutrimentos está asociada a propiedades del suelo como el pH y los coloides (humus, arcillas y óxidos) (Drinkwater y Snapp, 2007) y estos a su vez, son producto de los procesos edafogénicos (Lambert et al., 1980) y de las prácticas de manejo agrícola (Larsen et al., 2015). Finalmente, es probable que la disponibilidad de nutrimentos en los agroecosistemas ya sea por procesos naturales o por prácticas agrícolas (fertilización

continua), ejerza una presión de selección en las poblaciones nativas de HMA y en consecuencia, la simbiosis micorrícica (Pánková et al., 2014). Entonces, la integración de los elementos físicos y químicos del suelo aunado a las prácticas de manejo, como la fertilización, podrían ser un mejor acercamiento para documentar la contribución de la simbiosis micorrícica en sistemas de producción de maíz. Futuros trabajos que permitan entender como la fertilización mineral influye las interacciones micorrícicas, podrían incluir la aplicación de diferentes niveles o dosis de fertilización fosforada, nitrogenada y su combinación acordes a las propiedades de los suelos.

Genotipo de maíz

Hasta ahora, es reconocido que la compatibilidad funcional entre los HMA y el genotipo de las plantas es uno de los elementos más importantes que definen la simbiosis micorrícica (Johnson et al., 1997). Sin embargo, aún se desconocen como las variaciones entre diferentes genotipos o incluso entre individuos de una especie pueden condicionar que los HMA establezcan interacciones mutualistas o antagonistas.

Los resultados de esta tesis mostraron que las interacciones micorrícicas pueden variar dependiendo del genotipo de maíz (nativo o híbrido) y de las prácticas de manejo agrícola. Al respecto, se evidenció que: 1) La colonización micorrícica puede variar en función tanto del genotipo de maíz como de las propiedades del suelo, 2) El porcentaje de colonización no necesariamente está vinculada con el efecto de los HMA sobre sus hospederos, y 3) Los HMA nativos pueden reducir e incrementar los síntomas de estrés hídrico entre maíces híbridos y nativos respectivamente

Como se mencionó, en el suelo se encuentran contenidos los minerales necesarios para el crecimiento de las plantas, aunque solo una fracción de los nutrientes están disponibles (Drinkwater y Snapp, 2007). Sin embargo, el maíz ha desarrollado mecanismos para adquirir nutrientes como: el incremento del volumen y modificación de la arquitectura de las raíces; síntesis y deposición de exudados a la rizósfera para solubilizar nutrientes; y la asociación con microorganismos como HMA y bacterias diazotróficas de vida libre pero asociadas a las raíces (Calderón-Vázquez et al., 2009; Van Deynze et al., 2018). Dichos mecanismos dependen de la capacidad genética de las plantas para expresar genes de

respuesta e inducir los cambios en la fisiología de las plantas (Hochholdinger, 2009). Por otro lado es necesario considerar que el material genético está más conservado en las variedades nativas que en los híbridos, por lo que es probable que los genotipos nativos conserven más mecanismos de respuesta a estrés y por ende, dependan menos de los HMA (Ranum et al., 2014). En este sentido, la comparación entre una variedad de maíz eficiente en el uso de nutrimentos con respecto a otra no eficiente, resultó en un mayor porcentaje de colonización micorrícica en el genotipo deficiente y a su vez una posible mayor dependencia de la simbiosis micorrícica de los genotipos menos eficientes para adquirir nutrimentos (Montaño et al., 2001). Con base en lo anterior, cobra sentido que las interacciones micorrícicas estén influidas por la compatibilidad entre el genotipo de maíz y los elementos del ambiente, como el contenido de nutrimentos del suelo.

Una pregunta que surge es: ¿Existe una relación entre el desarrollo de variedades híbridas y la función de los HMA? Al respecto, An et al., (2010) propusieron que la colonización micorrícica es independiente a los procesos de domesticación o mejoramiento. Sin embargo, durante el proceso de hibridación, se seleccionan atributos “deseables”, como el rendimiento o el volumen de raíces, lo cual implica la discriminación de fenotipos y en consecuencia, pérdida de genes de las razas de origen (Ortega-Paczka, 2003). Así mismo, la pérdida del genotipo podría reducir la capacidad para adquirir los nutrimentos del suelo y por lo tanto, los híbridos podrían ser más dependientes de los microorganismos del suelo para adquirir los nutrimentos del suelo (Yang et al., 2018). Por otro lado, se ha sugerido que el desarrollo de variedades mejoradas de maíz podría estar ligada a una mayor compatibilidad entre los HMA y sus hospederos (Chu et al., 2013). Esto podría explicar por qué la variedad de maíz híbrido desarrolló menores síntomas de estrés hídrico en comparación con los maíces nativos.

Irrigación

La disponibilidad de agua es la principal limitante para la producción de alimentos y en el contexto del cambio climático, la agricultura de temporal se vuelve más vulnerable (Stoate et al., 2009). Ante este fenómeno, se han desarrollado estrategias para mantener la producción del maíz bajo condiciones erráticas del periodo de lluvias (Murray-Tortarolo et al., 2018), entre las principales tecnologías se encuentran: el uso de variedades mejoradas

de maíz resistentes a sequía, sistemas de riego eficientes y el desarrollo de inóculos de microorganismos comerciales que mitigan el estrés hídrico (Chami y Moujabber, 2016). Una de las funciones de los HMA, además de transportar nutrimentos de la solución del suelo a la planta, es la mitigación de estrés hídrico a través de la estimulación de mecanismos fisiológicos y moleculares de respuesta como la síntesis de osmolitos, proteínas, aminoácidos, antioxidantes y azúcares (Augé et al., 2014; Quiroga et al., 2017). Ante esto, los resultados de esta tesis indican que la capacidad de los HMA nativos para reducir el estrés hídrico depende tanto del genotipo de maíz, como de la variable de respuesta estudiada.

Como se ha mencionado, las interacciones micorrícicas pueden establecerse en un continuo del mutualismo al parasitismo (Klironomos, 2003) además, la relación entre los HMA, sus hospederos y el ambiente es un elemento fundamental en la expresión de la simbiosis micorrícica (Johnson y Graham, 2013). En los resultados presentados, los HMA nativos inoculados en el genotipo de maíz híbrido, pudieron reducir los síntomas de estrés hídrico. Lo anterior ya había sido mostrado por Quiroga et al. (2017), quienes evaluaron dos genotipos de maíz inoculados con HMA, y concluyeron que los HMA pueden interactuar de forma diferente entre genotipos de maíz bajo las mismas condiciones de irrigación. Entonces, es posible plantear la hipótesis de que los maíces híbridos han perdido mecanismos de respuesta a diferentes tipos de estrés, por lo que las variedades mejoradas podrían ser más micodependientes que las variedades nativas. Esta hipótesis fue parcialmente explorada por An et al., (2010), quienes concluyeron que los procesos de mejoramiento del maíz no afectan la colonización micorrícica. Aunque es aceptado que no hay una relación directa entre la micorrización y el efecto de los HMA sobre sus hospederos (Armada et al., 2015; Gavito y Varela, 1995).

Manejo de la simbiosis micorrícica en condiciones de campo

Se ha propuesto que los HMA nativos en cultivo monoxénico, consorcio o productos comerciales, podrían ser un mecanismo biológico que permite reducir el uso de insumos agrícolas y promover la sustentabilidad de los agroecosistemas (Gianinazzi et al., 2010). Sin embargo, el estudio de la simbiosis micorrícica en condiciones de campo ha sido poco explorada y en los avances en condiciones de invernadero no necesariamente son

replicables en los sistemas agrícolas (Ryan y Graham, 2018). En este sentido, los resultados en campo mostraron que el aporte de los HMA nativos en el desarrollo, producción y calidad del grano de maíz depende de: 1) La etapa del crecimiento, 2) La fertilización mineral, y 3) Del genotipo de maíz.

Para entender el papel de la simbiosis micorrícica bajo condiciones de campo, es necesario considerar que los HMA pueden interactuar directa o indirectamente con todo el microbioma de la rizósfera (Turrini et al., 2018), así como con la macro, meso y microfauna del suelo (Lynch y de Leij, 2012) y e incluso, con el ambiente. De hecho, es aceptado que la función de los HMA puede ser complementada o estimulada por “mycorrhizal helpers”, quienes son bacterias, actinobacterias o levaduras asociadas a la micorrizósfera o a las esporas (Battini et al., 2017; Sarabia et al., 2017; Van Deynze et al., 2018). Estas interacciones hacen complejo el entendimiento de la simbiosis micorrícica bajo condiciones de campo, además la aplicación de tratamientos para tener controles libres de HMA podría afectar la biota del suelo y por tanto, la interpretación de los resultados podría mostrar un sesgo en comparación los resultados obtenidos en laboratorio.

La contribución de los HMA nativos en el rendimiento de diferentes cultivos bajo condiciones de campo, puede ser modificada por múltiples factores como las prácticas agrícolas (uso de agroquímicos, la selección del genotipo, etc) (Williams et al., 2017), elementos del ambiente (temperatura, fertilidad del suelo, etc) (Pánková et al., 2014) y la composición de la comunidad de microorganismos del suelo, incluyendo las poblaciones nativas de HMA (Alvarado-Herrejón et al., 2018). La estructura de la comunidad de microorganismos del suelo también puede ser modificada por las plantas a través de las rizodeposiciones de compuestos orgánicos (Drinkwater y Snapp, 2007). Por su parte, la capacidad del maíz para sintetizar rizodeposiciones está condicionada a su etapa de desarrollo, la deficiencia de nutrientes de la planta y de la interacción, *per se*, con los microorganismos del suelo (Calderón-Vázquez et al., 2009). Así mismo, se ha visto que algunas prácticas de manejo como la labranza o la fertilización mineral pueden también modificar la composición de la comunidad de microorganismos de la rizósfera de maíz (Roesti et al., 2006).

Con el incremento del uso de HMA comerciales en la agricultura, son urgentes los estudios que sobre los impactos de estos bioproductos sobre la microbiota edáfica nativa (Chen et al., 2018). Hasta ahora, se sabe que la inoculación con HMA comerciales puede modificar la composición de las comunidades nativas de hongos y bacterias del suelo (Akyol et al., 2018), sin embargo, aún se desconoce si la modificación de la estructura de las comunidades de microorganismos puede tener un efecto en el funcionamiento de suelo. Lo anterior sugiere que es necesario el desarrollo de prácticas de manejo agrícola, que fomenten las interacciones mutualistas entre los HMA, la microbiota, los elementos del ambiente y la productividad de las plantas cultivadas, que sean de bajo impacto y que puedan implementarse con poca inversión económica. En la presente tesis, fue posible observar que las prácticas de fertilización que son “recomendadas” para la producción de maíz en un Vertisol, no necesariamente son adecuadas para hacer más eficiente la simbiosis micorrícica. Si bien, la fertilización mineral es una de las prácticas agrícolas que han permitido el incremento de la producción de alimentos alrededor del mundo, también ha tenido fuertes impactos en las características físicas, químicas y biológicas de los suelos manejados (Stoate et al., 2009).

Un mecanismo que podría ayudar al entendimiento de la simbiosis micorrícica, podría ser mediante la correlación entre los servicios ecosistémicos que realizan los HMA y las funciones edafocológicas que tienen los suelos. Las funciones edafocológicas permiten conocer la aptitud o bondad que tiene un suelo con respecto a determinadas funciones ecológicas, como la agricultura o la conservación de nutrientes (Bedolla-Ochoa et al., 2018; Lehmann y Stahr, 2010), entonces, es posible suponer que las funciones de los HMA estén determinadas por las propiedades del suelo y sus funciones, sin embargo, no existen referencias científicas de esto.

Entonces, para valorar las interacciones micorrícicas en condiciones de campo, es necesario considerar un enfoque holístico, en donde las evaluaciones incluyan por un lado, la ganancia o reducción de la biomasa de los hospederos, los elementos fisiológicos de ambos simbiontes, la salud de las plantas, la cantidad y calidad de los frutos o propágulos de los HMA. Por otro lado, la integración los elementos bióticos, abióticos y las prácticas de

manejo que definen los agroecosistemas y que pueden interactuar o influir sobre la simbiosis micorrícica (Chen et al., 2018).

Conclusiones generales

Los microorganismos rizosféricos nativos pueden reducir la deficiencia de P en el crecimiento del maíz pero no la de N; así mismo la fertilización con N y P promueve que los microorganismos nativos de un Luvisol y un Andosol reduzcan el crecimiento y nutrimentos en el follaje del maíz.

Independientemente del grupo de suelo en que fueron colectados, los HMA nativos incrementaron la absorción de fósforo de las razas nativas Ancho, Chalqueño y el híbrido Puma, además los mayores crecimientos fueron observados en un Andosol.

El genotipo de maíz juega un papel fundamental en la expresión de la simbiosis micorrícica. En este sentido, los genotipos híbridos se beneficiaron más de la colonización por HMA nativos, en especial bajo condiciones de estrés hídrico.

Bajo condiciones de campo, los HMA nativos de un Vertisol estimularon una mayor producción de fibras y carbohidratos en los genotipos de maíz híbridos y nativos respectivamente. A demás, la fertilización con fósforo no fue el mejor predictor del efecto de los HMA nativos sobre el crecimiento y calidad de la semilla del maíz.

Finalmente, la presente tesis sugiere que para aprovechar la simbiosis micorrícica como una herramienta para reducir el uso de fertilizantes químicos en la producción de maíz, es necesario considerar que la función de los microorganismos rizosféricos nativos depende de la fertilización mineral y del genotipo de maíz. Finalmente, se refuerza la necesidad de validar el conocimiento de la simbiosis micorrícica bajo condiciones de campo.

Literatura citada

Akyol, T.Y., Niwa, R., Hirakawa, H., Maruyama, H., Sato, T., Suzuki, T., Fukunaga, A., Sato, T., Yoshida, S., Tawaraya, K., Saito, M., Ezawa, T., Sato, S., 2018. Impact of introduction of arbuscular mycorrhizal fungi on the root microbial community in agricultural fields. *Microbes Env.* 00, 0-000.

- <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18109>
- Alvarado-Herrejón, M., Larsen, J., Gavito, M.E., Jaramillo-López, P.F., Vestberg, M., Martínez-Trujillo, M., Carreón-Abud, Y., 2018. Relation between arbuscular mycorrhizal fungi, root-lesion nematodes and soil characteristics in maize agroecosystems. *Appl. Soil Ecol.* <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2018.10.019>
- An, G.H., Kobayashi, S., Enoki, H., Sonobe, K., Muraki, M., Karasawa, T., Ezawa, T., 2010. How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasms. *Plant Soil* 327, 441–453. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0073-3>
- Armada, E., Azcón, R., López-Castillo, O.M., Calvo-Polanco, M., Ruiz-Lozano, J.M., 2015. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 90, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.004>
- Augé, R.M., Toler, H.D., Saxton, A.M., 2014. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25, 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0585-4>
- Battini, F., Grønlund, M., Agnolucci, M., Giovannetti, M., Jakobsen, I., 2017. Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Sci. Rep.* 7, 4686. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04959-0>
- Bedolla-Ochoa, C., Bautista, F., Gallegos, Á., 2018. Environmental functions of smallholder farmer land classes in the Zicuirán-Infiernillo Biosphere Reserve, Mexico Funciones ambientales de las clases de tierras campesinas en la Reserva de la Biosfera Zicuirán-Infiernillo, México. *Rev. Chapingo Ser. Ciencias For. y del Ambient.* 3, 265–274. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.09.058>
- Calderón-Vázquez, C., Alatorre-Cobos, F., Simpson-Williamson, J., Herrera-Estrella, L., 2009. Maize under phosphate limitation, en: *Handbook of maize: Its biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 381–404. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1_19
- Chami, D., Moujabber, M., 2016. Drought, climate change and sustainability of water in agriculture: A roadmap towards the NWRS2. *S. Afr. J. Sci.* Volume 112, 104–107. <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20150457>
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., Reinhardt, D., 2018. Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi – from ecology to application. *Front. Plant Sci.* 9, 1270. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>
- Chu, Q., Wang, X., Yang, Y., Chen, F., Zhang, F., Feng, G., 2013. Mycorrhizal responsiveness of maize (*Zea mays* L.) genotypes as related to releasing date and available P content in soil. *Mycorrhiza* 23, 497–505. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0492-0>
- Drinkwater, L.E., Snapp, S.S., 2007. Nutrients in Agroecosystems: Rethinking the management paradigm. *Adv. Agron.* [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(04\)92003-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(04)92003-2)
- Gavito, M.E., Varela, L., 1995. Response of “crillo” maize to single and mixed species inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi 76, 101–105. <https://doi.org/10.1007/BF00017680>
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.N., van Tuinen, D., Redecker, D., Wipf, D., 2010. Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Gryndler, M., Larsen, J., Hřšelová, H., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., Kubát, J., 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0027-4>
- Hochholdinger, F., 2009. The maize root system: morphology, anatomy, and genetics, en: Bennetzen J.L., H.S.C. (Ed.), *Handbook of maize: its biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 145–160. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1_8
- Ji, B., Gehring, C.A., Wilson, G.W.T., Miller, R.M., Flores-Rentería, L., Johnson, N.C., 2013. Patterns of diversity and adaptation in Glomeromycota from three prairie grasslands. *Mol. Ecol.* 22, 2573–2587. <https://doi.org/10.1111/mec.12268>
- Johnson, N.C., Graham, J.H., 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant Soil.* <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1406-1>
- Johnson, N.C., Graham, J.H., Smith, F.A., 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.* 135, 575–585. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00729.x>
- Johnson, N.C., Wilson, G.W.T., Bowker, M.A., Wilson, J.A., Miller, R.M., 2010. Resource limitation is a

- driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2093–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906710107>
- Johnson, N.C., Wilson, G.W.T., Wilson, J.A., Miller, R.M., Bowker, M.A., 2015. Mycorrhizal phenotypes and the law of the minimum. *New Phytol.* 205, 1473–1484. <https://doi.org/10.1111/nph.13172>
- Jones, D.L., Magthab, E.A., Gleeson, D.B., Hill, P.W., Sánchez-Rodríguez, A.R., Roberts, P., Ge, T., Murphy, D.V., 2018. Microbial competition for nitrogen and carbon is as intense in the subsoil as in the topsoil. *Soil Biol. Biochem.* 117, 72–82. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2017.10.024>
- Klironomos, J.N., 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84, 2292–2301. <https://doi.org/10.1890/02-0413>
- Lambert, D.H., Cole, H., Baker, D.E., 1980. Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytol.* 85, 513–520. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb00766.x>
- Lanfranco, L., Fiorilli, V., Gutjahr, C., 2018. Partner communication and role of nutrients in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 220, 1031–1046. <https://doi.org/10.1111/nph.15230>
- Larsen, J., Jaramillo-Lopez, P., Najera-Rincon, M., Gonzalez-Esquivel, C.E., 2015. Biotic interactions in the rhizosphere in relation to plant and soil nutrient dynamics. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15, 449–463. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000039>
- Lehmann, A., Stahr, K., 2010. The potential of soil functions and planner-oriented soil evaluation to achieve sustainable land use. *J. Soils Sediments* 10, 1092–1102. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0207-5>
- Lynch, J.M., de Leij, F., 2012. *Rhizosphere*, eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000403.pub2>
- Ma, M., Ongena, M., Wang, Q., Guan, D., Cao, F., Jiang, X., Li, J., 2018. Chronic fertilization of 37 years alters the phylogenetic structure of soil arbuscular mycorrhizal fungi in Chinese Mollisols. *AMB Express* 8, 57. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0587-2>
- Montaño, A.N., Quiroz, G. V, Cruz, G., 2001. Colonización micorrízica arbuscular y fertilización mineral de genotipos de maíz y trigocultivados en un Andisol. *Terra Latinoam.* 19.
- Montaño, N.M., Alarcón, A., Camargo-Ricalde, S.L., Hernández-Cuevas, L.V., Álvarez-Sánchez, J., González-Chávez, M. del C.A., Gavito, M.E., Sánchez-Gallen, I., Ramos-Zapata, J., Guadarrama, P., Maldonado-Mendoza, I.E., Castillo-Argüero, S., García-Sánchez, R., Trejo, D., Ferrera-Cerrato, R., 2012. Research on arbuscular mycorrhizae in Mexico: an historical synthesis and future prospects. *Symbiosis* 57, 111–126. <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0184-0>
- Murray-Tortarolo, G.N., Jaramillo, V.J., Larsen, J., 2018. Food security and climate change: the case of rainfed maize production in Mexico. *Agric. For. Meteorol.* 253–254, 124–131. <https://doi.org/10.1016/J.AGRFORMET.2018.02.011>
- Ortega-Paczka, R., 2003. La diversidad del maíz en México, en: Esteva, G., Marielle, C. (Eds.), *Sin maíz no hay país*. CONACULTA, México D.F., pp. 123–154.
- Pánková, H., Münzbergová, Z., Rydlová, J., Vosátka, M., 2014. Co-adaptation of plants and communities of arbuscular mycorrhizal fungi to their soil conditions. *Folia Geobot.* 49, 521–540. <https://doi.org/10.1007/s12224-013-9183-z>
- Quiroga, G., Erice, G., Aroca, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J.M., 2017. Enhanced drought stress tolerance by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in a drought-sensitive maize cultivar is related to a broader and differential regulation of host plant aquaporins than in a drought-tolerant cultivar. *Front. Plant Sci.* 8, 1056. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01056>
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1312, 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
- Roesti, D., Gaur, R., Johri, B., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K., Aragano, M., 2006. Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1111–1120. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.09.010>
- Ryan, M.H., Graham, J.H., 2018. Little evidence that farmers should consider abundance or diversity of arbuscular mycorrhizal fungi when managing crops. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.15308>
- Sarabia, M., Cornejo, P., Azcón, R., Carreón-Abud, Y., Larsen, J., 2017. Mineral phosphorus fertilization modulates interactions between maize, rhizosphere yeasts and arbuscular mycorrhizal fungi. *Rhizosphere* 4, 89–93. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2017.09.001>
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd ed. Academic Press.
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev->

arplant-042110-103846

- Stoate, C., Báldi, A., Beja, P., Boatman, N.D., Herzog, I., van Doorn, A., de Snoo, G.R., Rakosy, L., Ramwell, C., 2009. Ecological impacts of early 21st century agricultural change in Europe - A review. *J. Environ. Manage.* <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.07.005>
- Treseder, K.K., Allen, M.F., 2002. Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: A model and field test. *New Phytol.* 155, 507–515. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00470.x>
- Turrini, A., Avio, L., Giovannetti, M., Agnolucci, M., 2018. Functional complementarity of arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota: The challenge of translational research. *Front. Plant Sci.* 9, 1407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01407>
- Van Deynze, A., Zamora, P., Delaux, P.M., Heitmann, C., Jayaraman, D., Rajasekar, S., Graham, D., Maeda, J., Gibson, D., Schwartz, K.D., Berry, A.M., Bhatnagar, S., Jospin, G., Darling, A., Jeannotte, R., Lopez, J., Weimer, B.C., Eisen, J.A., Shapiro, H.Y., Ané, J.M., Bennett, A.B., 2018. Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. *PLoS Biol.* 16, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006352>
- Williams, A., Manoharan, L., Rosenstock, N.P., Olsson, P.A., Hedlund, K., 2017. Long-term agricultural fertilization alters arbuscular mycorrhizal fungal community composition and barley (*Hordeum vulgare*) mycorrhizal carbon and phosphorus exchange. *New Phytol.* 213, 874–885. <https://doi.org/10.1111/nph.14196>
- Xin-Xin, W., Xiaojing, W., Yu, S., Yang, C., Shitong, L., Xinping, C., Gu, F., Kuyper, T.W., 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi negatively affect nitrogen acquisition and grain yield of maize in a N deficient soil. *Front. Microbiol.* 9, 418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00418>
- Yang, H., Schroeder-Moreno, M., Giri, B., Hu, S., 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi and their responses to nutrient enrichment, in: Giri, B., Prasad, R., Varma, A. (Eds.), *Root Biology*. Springer, Cham, pp. 429–449. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_17