



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

**INTERACCIONES MULTITRÓFICAS ENTRE MAÍZ-HONGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES E INSECTOS HERBÍVOROS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

RAÚL OMAR REAL SANTILLAN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOHN LARSEN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CDMX

FEBRERO DE 2020



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
ECOLOGIA

INTERACCIONES MULTITRÓFICAS ENTRE MAÍZ-HONGOS MICORRÍZICOS

ARBUSCULARES E INSECTOS HERBÍVOROS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

RAÚL OMAR REAL SANTILLAN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOHN LARSEN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CDMX

FEBRERO DE 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD IIES-M

OFICIO CPCB/048/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

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


Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **04 de noviembre de 2019**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **REAL SANTILLAN RAÚL OMAR** con número de cuenta **512027096**, con la tesis titulada "**Interacciones multitróficas entre maíz-hongos Micorrizicos arbusculares e Insectos herbívoros**", realizada bajo la dirección del **DR. JOHN LARSEN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ANA MABEL MARTÍNEZ CASTILLO
Vocal: DR. ÁNGEL REBOLLAR ALVITER
Secretaria: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI
Suplente: DR. LUIS LÓPEZ PÉREZ
Suplente: DRA. NANCY CALDERÓN CORTÉS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de enero de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Le agradezco primeramente a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Biológicas, por darme la oportunidad de superarme y alcanzar mis metas.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU/Becario: 480509).
- Al Dr. John Larsen por brindarme su amistad a lo largo de mi proceso de formación como Doctor en Ciencias, en el que me guio académicamente y me enseñó los saberes y deberes en el difícil arte de la investigación.
- A la Dra. Ek del Val de Gortari por su asesoría a lo largo del posgrado.
- A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega, por sus comentarios a la tesis y su interés para mejorar el proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia en especial a mi Mamá y a mis hermanos Alexis y Ramiro.

A Ornella por su apoyo y compañía en este recorrido.

A todos mis compañeros de laboratorio: John, Venecia, Paola, Dante, Semi, Rosa, Andrea, Carlos, Alfredo, Miguel, Ricardo, David, Osmar, Ceci, Oriana, Pablo, Marcela, Tsiri, Fany, Ana Lidia, Yadira, Rebeca, Hexón, Diego, Ivonne y Karla, por su amistad y compañerismo.

A mis amigos del ajedrez, Lenin, Noe y Waldo.

A Gris por amistad y su decisiva ayuda a lo largo de los experimentos.

A mi comité revisor: a la Dra. Ana Mabel Martínez Castillo, al Dr. Ángel Rebollar Alviter, a la Dra. Nancy Calderón Cortés y al Dr. Luis López Pérez por sus aportes en la revisión final de la tesis.

A la M.C. Maribel Nava Mendoza, por su apoyo y asesoría en la cuantificación de nitrógeno y fósforo. A la Lic. Leonarda Terán Cárdenas por ayudarme a todos los tramites del posgrado. A la Ing. Atzimba López Maldonado por su apoyo en la biblioteca. Al Dr. Heberto Ferreira Medina y al Maestro Alberto Valencia García por su ayuda técnica en telecomunicaciones.

A la naturaleza y a todas las cosas buenas del mundo.

Finalmente, a todas las personas que han sido muy importantes para mí y que se han perdido en la bruma del tiempo o que se me quedaron en el tintero.

DEDICATORIA

Con mucho cariño dedico mi Tesis

a mi querida Madre, que siempre me motivó

con su ejemplo para continuar mis estudios.

Doy gracias a Dios y a la vida por

concederme llegar a cumplir mis metas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 <i>Interacciones multitróficas</i>	3
2.2 <i>Variedades de maíz</i>	4
2.3 <i>Insectos herbívoros</i>	5
2.3.1 <i>S. frugiperda</i>	5
2.3.2 <i>P. vetula</i>	6
2.4 <i>Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)</i>	7
2.5 <i>Defensa vegetal</i>	8
2.5.1 <i>Defensas por respuestas constitutivas e inducidas</i>	9
2.6 <i>Interacciones entre plantas-HMA e insectos herbívoros</i>	9
2.6.1 <i>Interacciones entre plantas-HMA e insectos fitófagos arriba y abajo del suelo</i>	10
2.6.2 <i>Interacciones entre maíz-HMA e insectos herbívoros</i>	11
3. HIPÓTESIS.....	12
4. OBJETIVO GENERAL.....	12
4.1 <i>Objetivos particulares</i>	12
5. ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	13
CAPÍTULO 1	14
Response of hybrid and landrace maize to foliar and root insect herbivores	
CAPÍTULO 2	36
increased maize growth and p uptake promoted by arbuscular mycorrhizal fungi coincide with higher foliar herbivory and larval biomass of the fall armyworm <i>spodoptera frugiperda</i>	
CAPÍTULO 3	45
Las asociaciones micorrízicas modulan las interacciones entre insectos herbívoros arriba y abajo del suelo en plantas de maíz y en condiciones de invernadero	
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL	68
6. DISCUSIÓN	69
6.1 <i>Genotipos de maíz y herbivoría por insectos</i>	69
6.2 <i>Interacciones maíz-HMA</i>	70
6.3 <i>Interacciones maíz-HMA e insectos herbívoros</i>	71

6.3.1 Efecto de los HMA sobre la defensa vegetal	71
6.3.2 Efecto de los HMA sobre las interacciones entre insectos herbívoros arriba y abajo del suelo.....	72
6.4. Efecto de los insectos herbívoros sobre las asociaciones micorrízicas	72
7. CONCLUSIÓN.....	73
...	
8. REFERENCIAS GENERALES.....	74

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variedades de maíces criollos en México. Tomada de CIMMYT (https://www.cimmyt.org/wp-content/uploads/2016/05/Diversidad-Genetica-de-Maiz-Final.png).....	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i> . Tomada de BAYER® Crop Science México (www.bayercropscience.com.mx)	6
Figura 3. Ciclo de vida de <i>P. Vetula</i> . Tomada de BAYER® Crop Science México (www.bayercropscience.com.mx)	7
Figura 4. Hongos Micorrízicos Arbusculares. Elaboración propia.....	8
Figura 5. Interacciones multitróficas entre HMA, insectos herbívoros arriba y abajo del suelo y la planta de maíz como hospedero. Elaboración propia.....	12

RESUMEN

El maíz, es el cultivo más importante para la alimentación de los mexicanos. Sin embargo, una miríada de insectos herbívoros disminuye los rendimientos, causando pérdidas económicas a los agricultores. Para su control, es necesario implementar estrategias que reduzcan el impacto del uso de agroquímicos. Actualmente, este problema es encarado en el contexto del manejo agroecológico de plagas, en el que las interacciones entre organismos que coexisten en un agroecosistema juegan un papel importante. Entre estos microorganismos, se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), que se asocian con las raíces de la mayoría de las plantas. Hay un consenso en general de que los HMA tienen el potencial para mejorar la resistencia de las plantas hacia los insectos herbívoros masticadores y, por lo tanto, para reducir el daño que ellos causan. Sin embargo, aún es limitado el conocimiento sobre el efecto de los HMA sobre los insectos herbívoros en plantas de maíz. Para probar la hipótesis de que los HMA pueden mejorar la resistencia de las plantas, diseñamos una serie de experimentos en invernadero. En estos experimentos se usaron genotipos de maíz híbridos y nativos y un consorcio de HMA nativos procedentes de un suelo agrícola. Los insectos herbívoros *Spodoptera frugiperda* y *Phyllophaga vetula* fueron usados como ejemplo de herbívoros foliares y de la raíz, respectivamente. Los resultados principales muestran que el daño causado por los herbívoros depende de los genotipos de maíz. Por lo general los genotipos de maíz híbridos fueron menos afectados por *S. frugiperda*, mientras el efecto de *P. vetula* fue menos evidente. Por otra parte, los insectos que se alimentaron de plantas micorrizadas mostraron un mayor desarrollo. También, se encontró que el peso de los insectos herbívoros fue positivamente relacionado a la concentración de fósforo en las plantas. Otro resultado importante, es que *S. frugiperda* afectaron negativamente el desarrollo de *P. vetula* cuando los recursos fueron limitados en plantas no micorrizadas. En conclusión, contrario a nuestra hipótesis, que los HMA inducirían resistencia en las plantas, los insectos causaron un mayor daño en plantas con HMA. Sin embargo, el peso de las plantas no fue afectado por la mayor herbivoría en plantas con HMA que indica que algún nivel de tolerancia fue inducido por los HMA, quizá relacionado a una compensación al mejorar la calidad nutricional del hospedero que igual resultó en un mayor crecimiento de las larvas. También fue observado que las asociaciones micorrízicas tienen el potencial para modular la competencia interespecífica entre las dos especies de insectos herbívoros y volverla asimétrica. Estos resultados proporcionarían un nuevo conocimiento sobre las interacciones entre maíz-HMA e insectos herbívoros, para usarlo en estrategias de manejo de plagas. Sin embargo, futuros estudios deberían ser hechos bajo condiciones de campo y donde también se evaluó la defensa de planta.

ABSTRACT

Maize is the most important Mexican food crop. However, a myriad of herbivorous insects reduces maize yield, causing economic losses to farmers. To control these pests, it is necessary to implement new strategies that reduce the environmental impact of chemical pesticides. Currently, this problem begins to be faced, in the context of agroecological pest management, in which interactions between organisms that coexist in an agroecosystem play a key role among these microorganisms arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which associate with roots of most plants, are important to consider since they are known to alter the host phenotype. In general, there is a consensus that HMA have the potential to improve the resistance of plants to herbivorous chewing insects and, therefore, to reduce the damage they cause. However, the knowledge about the effect of HMA on herbivorous insects in maize plants is limited. Hence, to test the hypothesis that AMF can improve plant resistance, a series of greenhouse pot experiments were performed. Here hybrid and native maize genotypes and a consortium of native HMA from an agricultural soil were used. The insects *Spodoptera frugiperda* and *Phyllophaga vetula* were used as examples of foliar and root feeding herbivores, respectively. Main results show that landrace maize genotypes were more affected by herbivory than hybrid maize. On the other hand, herbivorous insects that fed on mycorrhizal plants presented a higher biomass than those feeding on non-mycorrhizal plants. Also, it was found that the weight of herbivorous insects is positively related to the phosphorus concentrations in the plant. Another important result that the foliar feeding insect *S. frugiperda* negatively affected the development of the root feeding insect *P. vetula*, when resources were limited feeding on non-mycorrhizal plants. In conclusion, contrary to our hypothesis, that the AMF would induce plant resistance against herbivorous insect pests, the insects showed a greater development when they fed on mycorrhized plants. Though mycorrhizal plants were more attacked by *S. frugiperda*, this was not reflected in the plant biomass, which indicates some level of tolerance induced by AMF maybe related to compensation by improving the host plant nutrition. It was also observed that mycorrhizal associations have the potential to modulate interspecific competition between the two herbivorous species in an asymmetric way. These results provide new knowledge on multitrophic interactions between maize, HMA and herbivorous insects, which can be used when developing sustainable pest management strategies. However, future studies should be done under field conditions to validate the results obtained under controlled conditions, where also plant defense reactions should be included to get a more complete picture of these multitrophic interactions.

INTRODUCCIÓN GENERAL



El Dios del maíz Centeotl en la cosmogonía mexicana. Tomada del códice Borgia.

1. INTRODUCCIÓN

El maíz *Zea mays* L. (Poaceae) se cultiva prácticamente en todos los países del mundo y es uno de los tres cereales más importantes, junto con el trigo y el arroz (Aydinsakir et al. 2013). En México, es la principal fuente de alimentación para la población (Álvarez-Buylla et al. 2011).

Se cree que es una de las primeras plantas cultivadas y domesticadas, hace aproximadamente 7000 años en México y proviene del teosintle que crece en la ribera del río Balsas (Muñoz et al. 2005). Actualmente, existen varias de razas de maíz nativas en México sujetas a domesticación (Llamas-Guzmán, 2016). También existen variedades comerciales, que han sido sujetas a una intensa domesticación con el fin de producir cada vez más grano, tanto para alimento humano y animal.

Sin embargo, insectos herbívoros de diversos ordenes mediante su alimentación, llegan a producir grandes pérdidas a los agricultores como: diabrótica, trips, gusano trozador, el frailecillo, gusano soldado, gusano elotero, chapulines, pulgones, picudos, gusano cogollero y la gallina ciega (Bahena y Velázquez, 2012).

Entre estos insectos, destacan por la severidad de sus daños, el gusano cogollero *S. frugiperda* L. (Lepidoptera: Noctuidae), que provoca grandes pérdidas debido a su voracidad y su gran capacidad de dispersión (Nagoshi et al. 2018). Se alimenta de las hojas de varios cultivos económicamente importantes como el Arroz, Trigo, Frijol, Jitomate, Soya, Algodón, entre otros. Otro de estos insectos plaga, es la denominada “gallina ciega”, que es un complejo de diversos géneros con hábitos edáficos que se alimentan de raíces y algunos de materia orgánica, entre estos, se encuentra la especie *Phyllophaga vetula* Horn (Coleoptera: Scarabeidae: Melolonthinae), que causa grandes pérdidas a los productores de maíz, al destruir el sistema radical de las plantas (Aragón et al. 2006).

Comúnmente estos insectos se combaten con el uso de agroquímicos, que tiene la desventaja de contaminar los suelos y el agua, dañando la salud humana y animal, así como degradando el medio ambiente (McConnell y Hruska, 1993), además que cada vez se genera más resistencia a ellos y por tanto es necesario elevar la dosis en concentración y frecuencia de aplicación, elevando los costos.

Sin embargo, se empieza a tratar este problema de las plagas, mediante el manejo agroecológico de plagas (Behena, 2015). Es decir, se empieza a utilizar un enfoque holístico en vez de uno reduccionista, donde el cultivo no es solamente la planta y los insectos que se alimentan

de su tejido, sino que se integra toda una miríada de micro y macroorganismos que conviven en el agroecosistema, en el cual se privilegian y estudian las interacciones multitróficas, con el fin de buscar alternativas sustentables y con el menor impacto ambiental.

Entre estos microorganismos benéficos para las plantas, se pueden encontrar los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los cuales son simbioses generalmente mutualistas del 80% de las plantas y su función principal es explorar el suelo en busca de agua y nutrientes (ej. fósforo, nitrógeno, Zinc, etc.) y transportarlos hacia las raíces, fungiendo como una extensión de estas (Smith y Read, 2008), a cambio, reciben carbohidratos de bajo peso molecular procedentes de la fotosíntesis (Smith y Read, 2008). Los HMA ofrecen diversos servicios ecosistémicos, tales como mejorar la salud y nutrición de la planta (Gianinazzi et al. 2010).

Existe un consenso general en la literatura, de que los HMA pueden ayudar a las plantas a defenderse o tolerar el ataque de los insectos herbívoros (Pozo y Azcón, 2007; Koricheva et al. 2009). Sin embargo, hay muy pocos trabajos donde se pongan a prueba esta interacción en plantas de maíz.

Por tanto, para mejorar el conocimiento sobre este tema, ideamos una serie de experimentos multifactoriales en un invernadero, teniendo como modelo la planta de maíz, los insectos *S. frugiperda* y *P. vetula*, principales plagas de las hojas y la raíz respectivamente, y un consorcio de HMA nativos procedente de un suelo agrícola.

Nuestra hipótesis principal fue que los HMA ayudarían a la planta a defenderse de los insectos herbívoros y reducirían su daño a la planta.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Interacciones multitróficas

Los seres que viven en la naturaleza conviven interactuando en complejas redes tróficas. Estas relaciones pueden ser positivas, negativas o neutras, cuando las especies buscan recursos, como nutrientes, agua y luz etc. (Price, 2004). Estas interacciones pueden ser por: competencia (-/-), depredación (+/-), parasitismo (+/-) y la herbivoría (+/-), amensalismo (-/0), comensalismo (+/0) y mutualismo (+/+) (del-Val y Boege, 2012).

Esta es la visión clave de la Agroecología, que nos permite enfrentar el problema desde otra visión, al integrar todas las especies que coexisten en un agroecosistema.

2.2 Variedades de maíz

Existen diversas variedades de maíz, en el país sujetas a domesticación (Fig. 1). Los primeros domesticadores seleccionaron progenitores para crear descendencias más productivas, adaptadas a las condiciones locales y resistentes a factores bióticos y abióticos (Pérez-Constantino, 2015).

Las variedades híbridas que son comercializadas, son plantas pequeñas, de tallo grueso, hoja ancha de verde intenso y que producen mucha raíz y grano. Los genotipos criollos o nativos en cambio, son plantas que producen menos grano, altas, alargadas, de tallo delgado, hojas también delgadas y su verdor es más apagado. Estas variedades criollas pueden llegar a producir más biomasa que los híbridos, la cual puede ser utilizada como forraje (Elizondo-Salazar y Boschini-Figueroa, 2002).



Figura 1. Variedades de maíces criollos en México. Tomada de CIMMYT (<https://www.cimmyt.org/wp-content/uploads/2016/05/Diversidad-Genetica-de-Maiz-Final.png>).

Las variedades criollas que se siembran en el país se usan en el mercado especializado de los platillos y especialidades culinarias, puesto que tienen características organolépticas (olor, textura, sabor), nutricionales (carbohidratos, proteínas) que los consumidores buscan (Pérez-Constantino, 2015) y que las casas comerciales no pueden suplir (Hellin y Keleman, 2013).

Las variedades criollas se pueden clasificar por la forma de sus mazorcas (alargadas, cónicas, cilíndricas y semicilíndricas), tipo de grano (ancho, dentado y reventador) y por su

coloración, que va desde: blanco, amarillo, rojo, morado, púrpura, azul, hasta negro (Fernández-Aulis, 2012; Meléndez et al. 2014).

Por otra parte, se cree que los genotipos criollos tienen una mejor defensa a los fitófagos, la cual depende del genotipo (Farias-Rivera et al. 2003), debido a que las variedades criollas al ser más cercanas al pariente silvestre (*Teocintle* sp.) poseen genes de defensa activos, ya que los genotipos híbridos han sufrido una intensa domesticación y los genes de defensa se han perdido o están silenciados (Rosenthal y Dirzo, 1997; Szczepaniec et al. 2013; García-Montalvo, 2016).

2.3 Insectos herbívoros

2.3.1 S. frugiperda

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), es un insecto polífago que tiene varios hospederos, entre ellos: el maíz (*Zea mays* L.), la soya (*Glycine max* L.), el algodón (*Gossypium hirsutum* L.), el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.), entre otros (Pogue, 2002). Se considera que este insecto es la principal plaga del maíz (Bahena y Cortez, 2015) y se estiman pérdidas en los rendimientos hasta del 50% y puede provocar la destrucción de la planta sino se da un manejo adecuado (Nexticapan-Garcéz et al. 2009). *S. frugiperda* se encuentra prácticamente en todo el continente americano, a excepción de zonas cercanas a los polos (Pogue, 2002). Estudios recientes han registrado su presencia en varios países de África Central, e incluso hay reportes de su llegada a la India (Goergen et al. 2016; Aditya et al. 2019).

Esta especie tiene un ciclo de vida holometábolo, es decir, tiene metamorfosis completa con cuatro fases: huevo, larva (seis estadios), pupa y adulto (Fig. 2).

S. frugiperda se controla principalmente con insecticidas químicos (McConnell y Hruska, 1993). Sin embargo, cada vez existe más resistencia y es necesario aplicar dosis más altas y con una mayor frecuencia, lo cual es peligroso para la salud humana y animal, además que supone un gasto importante al productor. Por lo anterior, cada vez existe más conciencia en utilizar estrategias de control alternativas, por ejemplo, el control mediante el uso de enemigos naturales, entre ellos: diversos depredadores, parasitoides, nematodos, bacterias, hongos y virus (Bahena y Cortez, 2015).

2.3.2 *P. vetula*

El complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) comprende cerca de 400 especies de escarabajos de diversos géneros con hábitos edáficos, rizófagos estrictos o facultativos que incluyen: *Phyllophaga*, *Diplotaxis*, *Macroductylus*, *Anomala*, *Cyclocephala*, *Dyscinetus*, *Strategus*, *Eutheola*, *Orizabus*, *Ligyris*, *Euphoria* y *Cotinis* (Pérez-Agis, 2001; Morón, 2006). Entre estos, el género *Phyllophaga* spp. Harris es posiblemente una de las plagas más conocidas por los campesinos por causar grandes daños a los cultivos, particularmente al maíz (Morón, 2010). En particular, la especie *Phyllophaga vetula* Horn (Coleoptera: Scarabeidae: Melolonthinae), ataca varios cultivos de interés comercial como: maíz, frijol, café, trigo, papa, arroz, cebolla, caña de azúcar, cacahuate, espinaca, zanahoria, tomate, sorgo, entre otros cultivos de importancia comercial (Aragón et al. 2006).

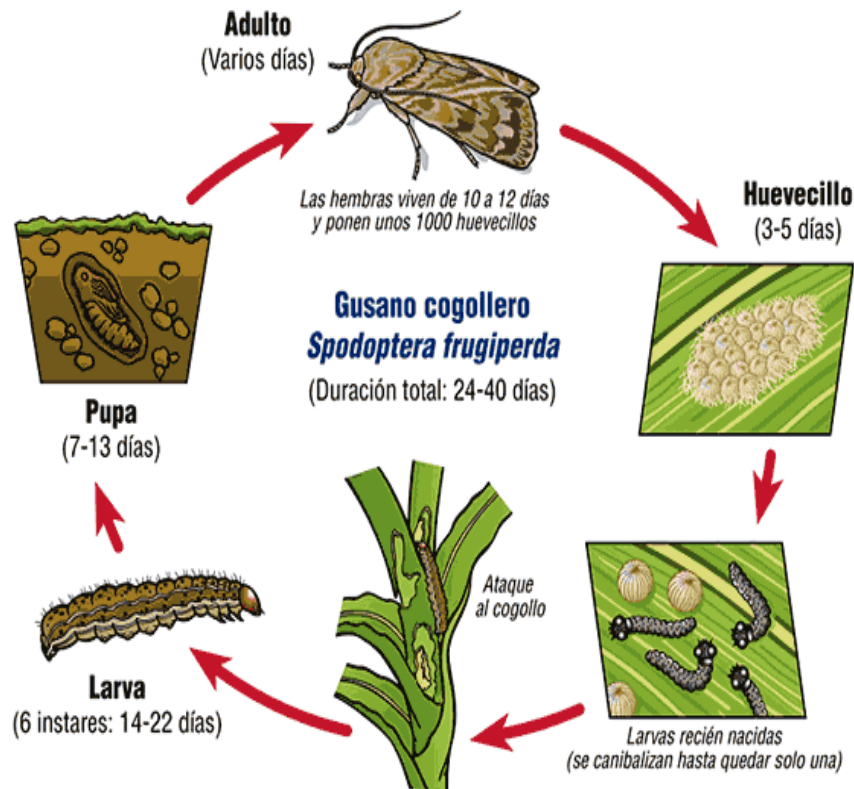


Figura 2. Ciclo de vida de *S. frugiperda*. Tomada de BAYER® Crop Science México (www.bayercropscience.com.mx).

P. vetula es un insecto holometábolo que tiene metamorfosis completa y tiene cuatro fases: huevo larva (tres estadios), pupa y adulto (Aragón et al. 2006: Fig. 3). En su etapa larval, se

alimenta de las raíces y partes subterráneas, pero cuando son adultos, emergen y consumen tejidos foliares, florales, de sostén y secreciones (Hernández-Cruz, 2010).

2.4 Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA)

Uno de los organismos más importantes que se encuentran en la rizósfera son los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), los cuales son simbioses del 80% de las plantas (Smith y Read, 2008). Los HMA tienen aproximadamente 400 millones de años realizando una simbiosis con las plantas (Smith y Read, 2008). Se llaman así, porque sus hifas penetran dentro de las células de la raíz y forman ramificaciones que se conocen como arbusculos, cuya función es conectarlos a la raíz y transportar nutrientes (Smith y Read, 2008; Fig. 4).

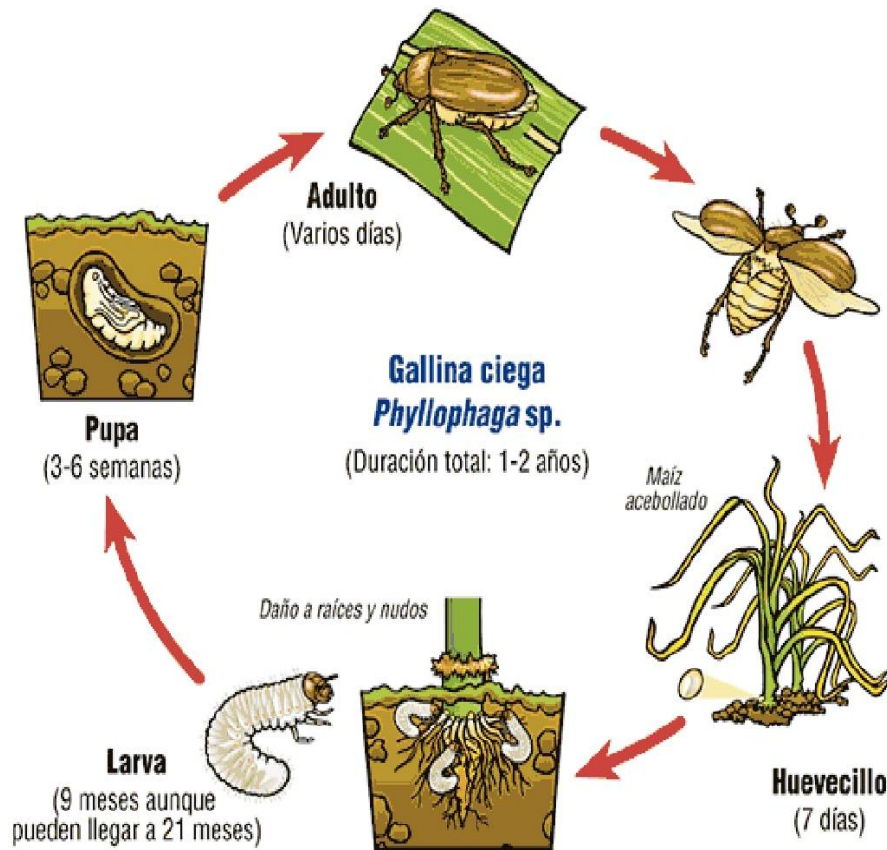


Figura 3. Ciclo de vida de *P. Vetula*. Tomada de BAYER® Crop Science México (www.bayercropscience.com.mx).

Los HMA son cruciales para la supervivencia de muchas plantas, puesto que tienen gran importancia en la exploración y transporte en el suelo de nutrientes, como el Fósforo (P), Nitrógeno (N) en forma de amonio, Zinc (Zn), Cobre (Cu) entre otros, así como de mejorar el

consumo de agua, incrementando el área de exploración y obteniendo a cambio carbohidratos de bajo peso molecular procedentes de la fotosíntesis (Smith y Read, 2008). Otro de los beneficios que los HMA proporcionan a las plantas, es el de mejorar la estructura del suelo ayudando a la formación de agregados y a mejorar la infiltración además de la aireación (Smith y Read, 2008). Sin embargo, la simbiosis entre las plantas y los HMA es costosa y puede llegar a consumir el 20% de los compuestos de carbono producidos por la fotosíntesis (Jakobsen y Rosendahl, 1990).

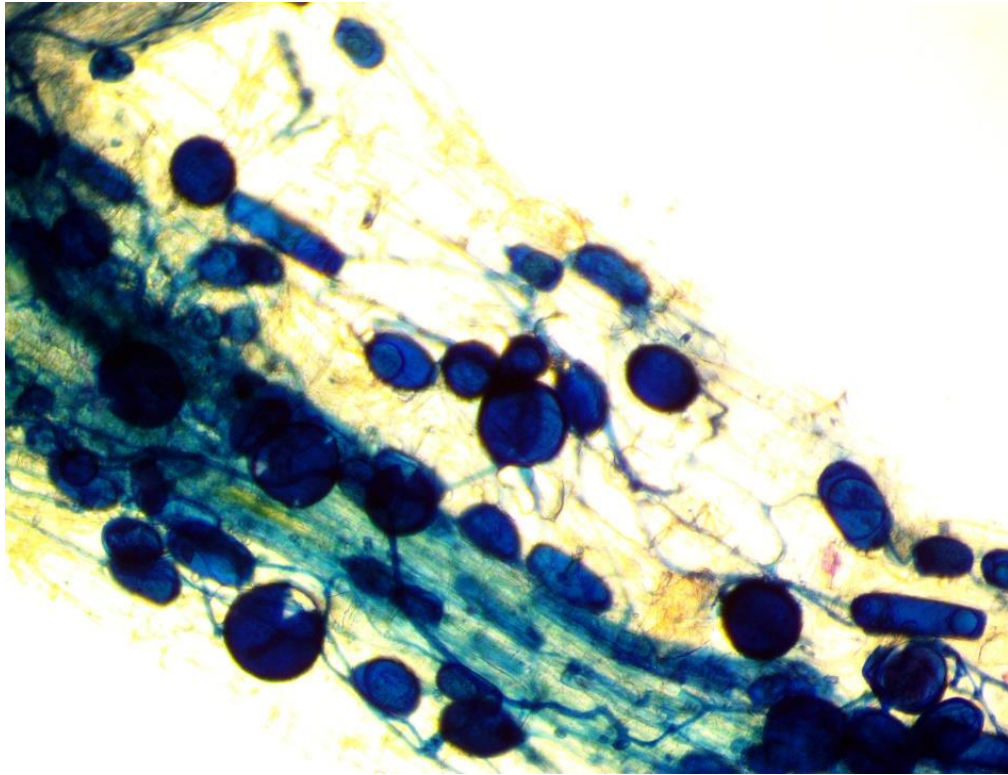


Figura 4. Hongos Micorrízicos Arbusculares. Elaboración propia.

2.5 Defensa vegetal

Los metabolitos secundarios son sustancias químicas que pueden fungir como venenos, repelentes o como advertencia para los herbívoros (del-Val, 2012). Entre estos compuestos se encuentran: los fenoles, alcaloides, terpenoides, proteínas, etc., (del-Val, 2012; Mithöfer y Maffei, 2016). Los fenoles como flavonoides, taninos, furanocumarinas, etc., son compuestos derivados de la vía del ácido shikimico. Los taninos hacen que las proteínas del tejido vegetal se precipiten y no puedan ser digeridas por los herbívoros (del-Val, 2012). Los alcaloides pueden bloquear la síntesis de biomoléculas, inhibir enzimas, interferir con la replicación del ADN, o actuar como neurotoxinas

(del-Val, 2012). Los terpenoides son constituyentes de aceites esenciales que tienen un efecto contra bacterias, hongos y artrópodos y pueden tener actividad deterrente y repelente de insectos (como la azadiractina) y algunos mamíferos (del-Val y Boege, 2012; Mithöfer y Maffei, 2016).

Las plantas son capaces de sintetizar aproximadamente 200,000 metabolitos secundarios de bajo peso molecular (Mithöfer y Maffei, 2016).

2.5.1 Defensas por respuestas constitutivas e inducidas

Una planta que se encuentra en un suelo pobre en nutrientes y es atacada por uno o varios insectos herbívoros, deberá enfrentarse al dilema de gastar esos recursos limitados en defenderse o en reproducirse (Schoonhoven, 2006). De esta manera, aunque las defensas son importantes para la planta, también son costosas, por lo que una rápida activación es crucial para controlar los ataques con éxito y disminuir el costo de estas (Pozo y Azcón, 2007).

Las plantas, tienen dos sistemas de defensa por resistencia: respuestas constitutivas e inducidas (Schoonhoven, 2006). Las respuestas constitutivas siempre están presentes en los tejidos, son específicas, tienen reducida toxicidad y pueden ser físicas (tricomas, ceras) o químicas (pequeñas cantidades de taninos, fenoles y otros) (Schoonhoven, 2006). En contraste, las respuestas inducidas se producen cuando existe un daño por fitopatógenos o insectos y se requiere que las plantas inviertan recursos adicionales, además de activarse rápida y eficazmente (Taiz y Zeiger, 2006). Las defensas también pueden ser locales o sistémicas (Schoonhoven et al. 2006).

2.6 Interacciones entre plantas-HMA e insectos herbívoros

Dos de las interacciones ecológicas más ampliamente distribuidas, son las que forman los insectos herbívoros con las plantas y la asociación simbiótica entre las plantas y los HMA, las cuales están presentes en todos los ecosistemas terrestres (Barber, 2013). La importancia de las asociaciones micorrízicas, fue ignorada por mucho tiempo en los estudios de interacciones entre planta-insectos herbívoros (Koricheva et al. 2009). Sin embargo, cada planta que se asocia con los HMA, probablemente tiene una o varias especies de insectos que se alimentan de esta (Koricheva et al. 2009). Además, las micorrizas tienen efectos significativos en todos los aspectos de los insectos herbívoros como son: el consumo de tejido, la tasa de crecimiento, peso, fecundidad, supervivencia y densidad (Koricheva et al. 2009).

También, es posible que las micorrizas puedan compensar a las plantas de los efectos negativos de la herbivoría al suministrarles nutrientes esenciales (Garrido et al. 2010), ayudarlas a resistir el ataque de microorganismos fitopatógenos e insectos herbívoros (Rabin y Pacovsky, 1985; Pozo y Azcón, 2007), e inducir una serie de respuestas ante el ataque de insectos para producir metabolitos secundarios y alterar las defensas químicas en los tejidos (Bi et al. 2007; Pozo y Azcón, 2007), incluso modificando la morfología y la fisiología de la planta y esto repercute en la calidad alimenticia que necesita el insecto (Schoonhoven et al. 2006).

Existen muchos reportes de los efectos positivos y negativos de los HMA sobre los insectos fitófagos (Gehring y Whitham 2002). No obstante, no todos los insectos y micorrizas responden de la misma manera, por tanto, diferentes especies de HMA tienen efectos distintos sobre el desarrollo de la planta y la herbivoría (Bennett y Bever 2007). Además, las asociaciones micorrízicas son un continuo que va del mutualismo al parasitismo (Klironomos, 2003). Por tanto, los HMA pueden aumentar las concentraciones de sustancias tóxicas en el follaje, resultando en la disminución del crecimiento de los insectos (Pozo et al. 2004 y Pozo y Azcón, 2007).

En general la mayoría de estudios sobre las interacciones de micorrizas con insectos, se han enfocado en herbívoros de la parte aérea mientras que los herbívoros de las raíces han sido poco estudiados (Gehring y Bennett, 2009). Es evidente que los artrópodos que se alimentan de las raíces tienen una interacción directa con los HMA. Es probable que los HMA, generalmente reduzcan el ataque de insectos herbívoros a la raíz mediante mecanismos físicos y químicos (Hartley y Gange 2009).

2.6.1 Interacciones entre plantas-HMA e insectos fitófagos arriba y abajo del suelo

En plantas micorrizadas, los insectos del follaje tienen un efecto negativo sobre los insectos de las raíces, al reducir los exudados (Gehring y Whitham, 2002). Además, los insectos que comen raíz, también pueden afectar a insectos que comen hojas mediante la alteración de la defensa inducida de la planta produciendo jasmonatos, ácido abscísico, ácido acetilsalicílico y ácido clorogénico (Erb et al. 2009).

La nutrición de la planta tiene un fuerte papel en el desempeño de los insectos (Van Dam et al. 2003), de ahí que, al alterar el contenido de nutrientes, la dinámica del carbono y producción de hormonas en las plantas, los HMA puedan mediar las interacciones de planta-insectos

herbívoros (Barber, 2013). Por tanto, las interacciones entre HMA, insectos herbívoros y las plantas como hospederos, son extremadamente complejas (Fig. 5).

2.6.2 Interacciones entre maíz-HMA e insectos herbívoros.

Existen algunos trabajos en los que se pone a prueba la interacción de este sistema Maíz-HMA con diversos insectos herbívoros.

En algunos trabajos se ha observado, que los insectos que se alimentan de las plantas de maíz, llegan a tener un buen mejor desarrollo, como lo observaron Aguilar (2017), utilizando el insecto generalista *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). También, García-Gómez (2019), observo un mayor desarrollo de *S. frugiperda* cuando se alimentó de plantas micorrizadas.

Otros trabajos, han encontrado que los adultos de lepidópteros, tienen preferencia a ovopositar sus huevecillos en plantas micorrizadas, tal como observaron Murrell et al. (2015), al estudiar en un invernadero la preferencia de oviposición del barrenador europeo del maíz *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae), encontraron una correlación positiva entre la oviposición de las hembras y la colonización micorrízica.

También en la raíz se ha encontrado este patrón, por ejemplo, Zitlalpopoca et al. (2017), al probar el sistema el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y *P. vetula*, observo que la gallina ciega tuvo una mayor herbivoría en raíces de maíz micorrizadas, también destaco que *B. bassiana* no tuvo efectos significativos sobre la mortalidad del insecto por la mejor nutrición conferida por los HMA.

En otro trabajo Murrell et al. (2019), usaron diversos cultivos de cobertura y probaron el insecto *O. nubilalis* en un cultivo posterior de maíz. Ellos encontraron que las defensas de las plantas aumentaron con el crecimiento del maíz y la colonización de HMA y esto hizo que la tasa de desarrollo del insecto disminuyera.

Incluso en trabajos con maíz modificado genéticamente, se ha probado esta interacción, como lo reportan Wang et al. (2019), que usaron plantas con el gen de la toxina *Bacillus thuringensis* en insectos de *Mythimna separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) y observaron que el efecto del maíz modificado con la toxina en los insectos fue potenciado cuando las plantas

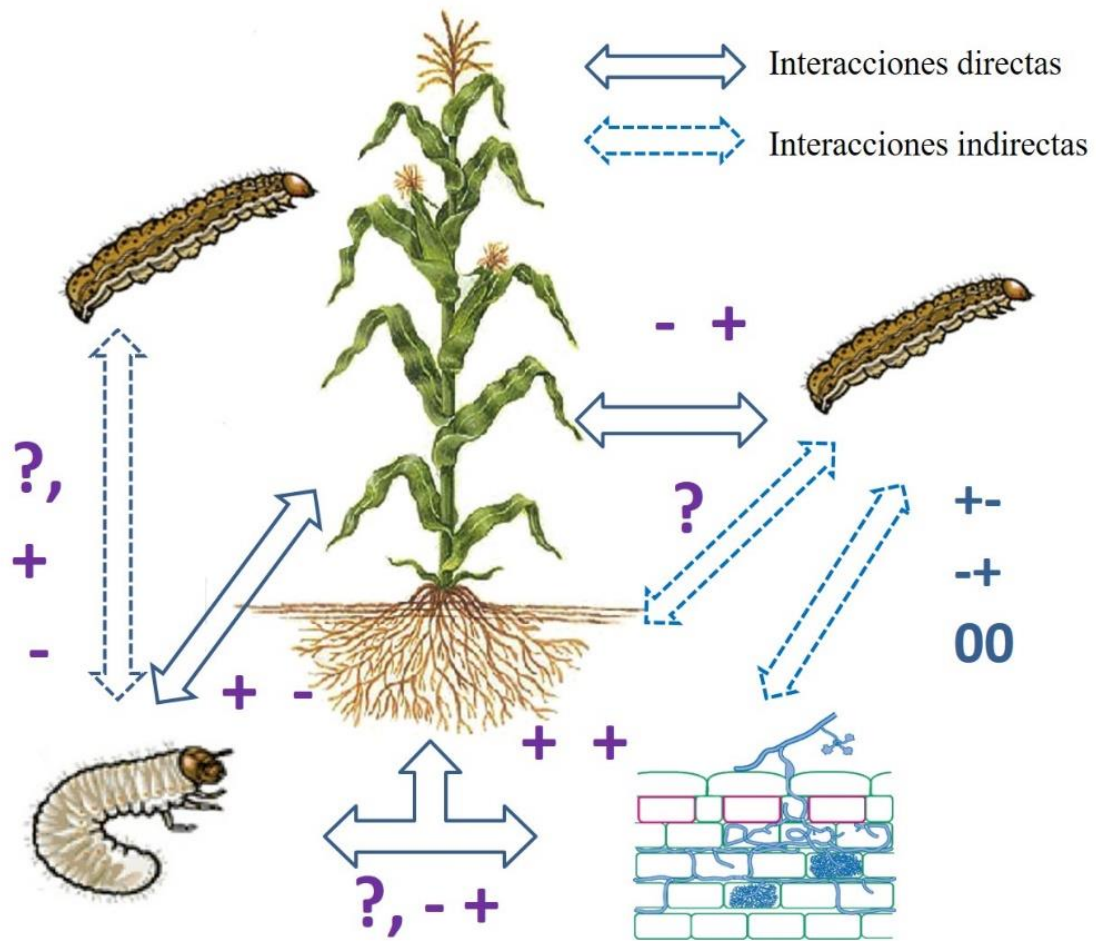


Figura 5. Interacciones multitróficas entre HMA, insectos herbívoros arriba y abajo del suelo y la planta de maíz como hospedero. Elaboración propia.

3. HIPOTESIS

Las asociaciones micorrízicas modulan las interacciones entre maíz-insectos herbívoros

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las interacciones multitróficas entre maíz-HMA-insectos herbívoros

4.1 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la herbivoría de *S. frugiperda* y *P. vetula* en diez variedades de maíz.

2. Evaluar el efecto de los HMA y el fósforo sobre el desempeño de *S. frugiperda* en dos variedades híbridas de maíz.
3. Evaluar el efecto de los HMA, sobre la interacción indirecta de los herbívoros *S. frugiperda* y *P. vetula* en plantas de maíz.

5. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Con el fin de cumplir los objetivos planteados en este trabajo, la presente tesis se estructuró en tres capítulos, discusión y conclusiones generales:

CAPÍTULO I:

En este apartado que integra dos estudios, uno con *S. frugiperda* y el otro con *P. vetula*, se muestra como los diversos genotipos de maíz tanto híbridos como criollos, presentan una respuesta diferente en su resistencia a las dos especies de insectos herbívoros.

CAPÍTULO II:

En este apartado se muestra como las asociaciones micorrízicas promueven el desarrollo del insecto foliar *S. frugiperda*. También es probable que puedan modular la defensa vegetal y hacer que oscile entre la tolerancia por compensación de nutrientes (plantas micorrizadas) y de resistencia (plantas no micorrizadas).

CAPÍTULO III:

En este apartado se muestra como las asociaciones micorrízicas pueden modular la interacción interespecífica entre los insectos foliares y de la raíz y cambiarla de simétrica en plantas con buena calidad nutricional a asimétrica en escenarios de limitación de recursos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES:

Finalmente, se integran los trabajos, se discuten y se formulan conclusiones de los efectos de las asociaciones micorrízicas, sobre la interacción entre los insectos herbívoros y la planta de maíz.

CAPÍTULO I

RESPONSE OF HYBRID AND LANDRACE MAIZE TO FOLIAR AND ROOT INSECT HERBIVORES



Larva (a) y adulto (b) del Gusano cogollero. Modificadas de LepIntercept (<https://idtools.org/id/leps/lepintercept/frugiperda.html>) y Lyle Buss, University of Florida (www.bugwood.org) respectivamente. Larva (c) y adulto (d) de la Gallina ciega. Modificadas de Green Lawn (Fertilizing www.greenlawnfertilizing.com/services/grub-control/) y Budguide (<https://bugguide.net/node/view/338198/bgimage>). Las imágenes no están a escala.

RESPONSE OF HYBRID AND LANDRACE MAIZE TO FOLIAR AND ROOT INSECT HERBIVORES

Abstract

Mexico is the center of maize domestication with a large diversity of landrace genotypes that have been planted since pre-Hispanic times because of economic, cultural and social reasons. These genotypes continue being planted by rural Mexican farmers, principally for filling the demand from local and specialized markets of culinary dishes because they possess organoleptic characteristics, for which the commercial hybrid varieties cannot be substituted. In general, all maize genotypes are attacked by herbivorous arthropods among which the Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and the White grub larvae (*Phyllophaga vetula*) cause serious yield losses, by feeding on leaves and roots respectively. During the selection process of landrace maize have been exposed to arthropod pests, and have developed mechanisms to resist or tolerate their attack to a higher degree than hybrid maize, which in most cases have been bred for other agronomic traits. Here we investigated the response of landrace and hybrid maize genotypes to herbivory from foliar and root feeding insects in two separate experiments with five maize landrace and five hybrid maize genotypes. The main results showed that landrace maize genotypes suffered from a higher level of herbivory by *S. frugiperda* than the hybrids, which coincided with higher larval growth. Root herbivory, measured in terms of root length no clear differences between landrace and hybrid maize were observed and overall only one out of the five maize genotypes for each type of maize were negatively affected from the presence of *P. vetula*. In conclusion, landrace and hybrid maize genotypes responded different to root and foliar herbivory. Key words: Maize genotypes, resistance, tolerance, insect food quality, agroecology

Introduction

Maize (*Zea mays* L.) is the most important grain crop in Mexico providing the basic source of carbohydrate in the Mexican diet (Arámbula *et al.*, 2004). This crop was domesticated between 8,000 to 10,000 years ago, through cumulative mutations, evolving in diverse habitats under natural and artificial selection starting from annual teocintle (*Zea mays* L. spp. *Parviglumis* Iltis & Doebley) from the Balsas River (Doebley, 2004; Mera and Caballero 2010; Sánchez, 2011). These genotypes were brought to the rest of the continent through indigenous human migration (Carrera-Valtierra *et al.*, 2010, Sánchez, 2011; Melendez *et al.*, 2014).

During this domestication process a great genetic richness of maize genotypes was developed, thanks to a constant high area of agricultural land with maize (Castillo, 2004; Kato *et al.*, 2013). Around 60 varieties of maize exist, which are cultivated both for human diet and fodder, as well as for making glucose syrup, biopolymers, polyvinyl, starch, fructose, mannose sugar, dextrans, corn oil, colorants, gluten and even biofuels like bioethanol (Salazar and Godínez, 2010; Cassidy *et al.*, 2013).

All the parts of maize biomass are used (Sánchez, 2011), as indicated by Salazar and Godínez (2010): “Nothing of maize is wasted nor is it lost, everything is used, including the leaves, both fresh and dry, the stalk, the ear, the corncob, the grains etc”. These maize genotypes differ in color (white, red, yellow, blue and violet) and shape (ear, oblong, conical, cylindrical and semicylindrical), as well as in grains (wide, toothed, popped, etc.; Meléndez *et al.*, 2014). In the state of Michoacán, 28 varieties have been reported, with high agricultural and cultural importance (Carrera-Valtierra *et al.*, 2010).

These landrace maize genotypes are very important for the diet of Mexicans; generally, they are used for a local and specialized market, for the preparation of specialties and appetizers, which the hybrid varieties from commercial trading houses cannot supply (Hellin and Keleman, 2013), mainly given their organoleptic characteristics (smell, texture, flavor), as well as nutritional and culinary value (Pérez-Constantino, 2015). For example, the varieties of hominy (*pozolero*) maize like *western elotes* and *anchos* are used for this type of food. The sweet, *yellow* and *chalqueño* maize are also widely used for the sale of roasted corn and vasolotes (creamed corn in a cup). In contrast, *blue maize* and *red Espada* are widely used in the making of blue tortillas and gorditas (a small filled pastry) (Hellin and Keleman, 2013). Furthermore, the use of these native varieties is related with the producers' economy, given that these seeds do not have an elevated cost like the hybrids, and part of the corn seeds harvested can be used in the following planting season (IRRI and CIMMYT, 2008).

In addition, these varieties are important because of their characteristics of industrial and cultural interest (Sánchez, 2011), such as, for example, the production of anthocyanin in the blue varieties, which can help in the elaboration of colorants, wine, jams, and fruit juices (Arellano *et al.*, 2003; Salinas-Moreno *et al.*, 2012). Thus, because of these characteristics the conservation of landrace maize genotypes is very important. Such characteristics are a pool of useful and desirable genes to conserve for incorporating them into new varieties (Fernández-Aulis, 2012; Pérez-

Constantino, 2015). Melendez *et al.*, (2014) mentioned that the genotypes can be classified through the shape of their cobs (oblong, conical, cylindrical and semicylindrical) and the type of kernel (wide, serrated, popped). Fernández-Aulis (2012) mentioned that they can be classified by their color: from white, yellow, red, violet, purple, blue up to black.

Nevertheless, a serious loss of genetic diversity exists because of substitution crops, such as the use of improved white maize emerging from trading houses that produce hybrid varieties, which come to produce a larger quantity of grain of better quality. In addition, this ultimately creates a smaller surface planted with landrace maize (Carrera-Valtierra *et al.*, 2010).

Added to this, maize is threatened by diverse insect attacks reducing the yields and the grain quality, as well as impacting the producers' economy (León, 2010). Among maize pests, the Fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith

(Lepidoptera: Noctuidae) is one of the principal ones in Mexico and in other countries of the continent because of its wide distribution and because of the damage it causes (Pogue, 2002). Another insect that causes large losses in this crop is the complex called the white grub worm (Castro-Ramírez and Ramírez-Salinas, 2010), mainly of the *Phyllophaga* Harris (Coleoptera: Scarabeidae: Melolonthinae) genus. In particular the species *Phyllophaga vetula* Horn (Coleoptera: Scarabeidae: Melolonthinae) that in its larval stage attacks the roots, resulting in important damage to the crops (Morón, 2010). Its management presents difficulties because of its edaphic habitats that are not visible, and the damage is observed only when it is very obvious (Morón, 2010). The maize plant forms a symbiotic association with the Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), the AMF expand the water and nutrient search area such as: Phosphorus (P), Nitrogen (N), Zinc (Zn) and transport them to roots, in return they receive carbohydrates from photosynthesis (Smith and Read, 2008). There is a consensus that AMF can induce plant resistance, and have a negative impact on chewing insects (Pozo and Azcón, 2007).

In general information on the response of maize genotypes to herbivory is limited (Farias *et al.*, 2003, Szczepaniec *et al.*, 2013). Hence, the objective of this study was to investigate the response of landrace and hybrid maize genotypes to foliar and root herbivory testing the main hypothesis that landrace maize genotypes are more resistant to herbivory than hybrid maize. In addition to verifying the contribution of AMF in the interaction with insects.

Materials and methods

Biological materials

Soil

Soil was obtained from the experimental field station of the National Agricultural University of Mexico, Campus Morelia, Michoacán, Mexico. Soil texture was clayish (53.2% clay, 27.3% silt and 19.5% sand) with the following chemical characteristics: organic matter = 2.7%, inorganic nitrogen = 23.2 mg kg⁻¹, plant available phosphorus (Olsen P) = 5.8 mg kg⁻¹, and pH (H₂O) = 7.3. Soil was mixed with quartz sand (1:1, w:w) and disinfected in an electric soil sterilizer at 90 °C for 24 hrs.

Plant nutrients were mixed into the soil (mg kg⁻¹ dry soil): K₂SO₄ (75.0), CaCl₂ x 2H₂O (75.0), CuSO₄ x 5H₂O (2.1), ZnSO₄ x 7H₂O (5.4), MnSO₄ x H₂O (10.5), MgSO₄ x 7H₂O (45), Na₂MoO₄ x 2H₂O (0.18) and NH₃NO₄ (30).

Maize genotypes

Ten varieties were used (5 hybrids or commercial varieties and 5 landraces), mainly planted because of their commercial importance, by producers in the Morelia-Queréndaro Valley located in the state of Michoacán, Mexico.

Hybrids:

NB9 of the Novasem[®] company. They indicate that it can develop under poor soil conditions and has a high tolerance of prolonged periods of high humidity or lack of water. Furthermore, it has a tolerance to the wheat rust (*Puccinia* sp.) and *Fusarium* sp., as well as a tolerance to the stress of an intermediate cycle, and is recommended for the Mexican Bajío (lowland states) (NOVASEM, 2017).

DK-2061 of the Dekalb[®] house, a subsidiary of Monsanto[®]. It has excellent grain quality, good foliar and ear health. In addition, it is rural with a good yield, has an intermediate cycle, good germination power, a semitoothed kernel and a tolerance to lodging (Monsanto, 2018).

CRM-52 of the CB[®] company, a subsidiary Monsanto[®]. In their technical brochure, CB, indicates that it has good emergency vigor, grain quality, tolerance to rust (*Puccinia* sp.), *Fusarium* sp., to the corn smut (*Sporisorium reilianum*) and a good tolerance to corn blight (*Exserohilum turcicum*), with good yield for kernels and silo, as well as outstanding foliar health. In addition, it tolerates lodging, is of intermediate cycle, and has a white grain, semicrystalline. It also has good germination power (CB, 2015).

PUMA from Asgrow[®]. It shows a lower height of the plant and ear, and has greater precocity and health that give it an advantage against lodging (Martínez *et al.*, 1999). The PUMA variety is currently discontinued, removed from the warehouse and substituted by the Antelope variety.

H-318 from the commercial trading house Milpal®. This hybrid was created and released by the National Institute of Forestry, Agricultural and Fishing Research (INIFAP for the Spanish abbreviation). It has good stability in different environments, is rural with good health, and is of intermediate cycle. It is recommended for limited sowing, and it produces deep roots, adapting itself to tropical or subtropical regions (Ruíz-Ramírez *et al.*, 2014; Milpal, 2015).

Native landraces:

Dulce: It grows between 1850 to 1950 m.a.s.l, in subtropical type climates toward the area of Álvaro Obregón and Tarímbaro, Michoacán. It is cultivated in seasonal agriculture conditions, and it is drought resistant (Carrera-Valtierra *et al.*, 2011). The plants have a medium height, are early developers, with abundant ahijamiento; the leaves are medium of width and length (Wellhausen *et al.*, 1951). The main pests that are present are the following: the fall armyworm (*S. frugiperda*) and the white grub worm (*Phyllophaga* spp.). Its very sweet ears are used for the sale of roasted corn, vasolotes, and pinole can be made (Carrera-Valtierra *et al.*, 2011).

Elotes occidentales: It grows between 1313 to 2057 m.a.s.l, in climates (A) C (w0) (w) and (A) C (w1) (w) of a subtropical type with rainwater precipitation of 625 to 1100 mm and a temperature of 17 to 22 °C. It is cultivated in irrigation and seasonal conditions (Carrera-Valtierra *et al.*, 2011). It is a substrain of the mealy corn maize of eight rows, with color in the aleurone and the pericarp (Wellhausen *et al.*, 1951). It is drought resistant. The main pests that it has are the following: fall armyworm (*S. frugiperda*), cutworm (*Agrotis ipsilon*), grub worm (*Phyllophaga* spp.) and grasshopper (*Melanoplus* spp). It is used for roasted corn, vasolotes, pozole and pinole (Carrera-Valtierra *et al.*, 2011).

Ancho: It grows in altitudes of 1311 to 1960 m.a.s.l, in climates (A) C (w1) (w) and (A) C (w0) (w) of the subtropical type, with rainwater precipitation 625 to 918 mm and an average temperature of 18.8 to 22 °C. It is mainly cultivated seasonally, and it is drought resistant (Carrera-Valtierra *et al.*, 2011). The main pests that attack it are the following: the fall armyworm (*S. frugiperda*), the cutworm (*Agrotis ipsilon*), and the grub worm (*Phyllophaga* spp.). It is mostly used for hominy stew and roasted corn; furthermore, it is very high and with much lodging (Carrera-Valtierra *et al.*, 2011).

Azul: It grows in the Morelia-Queréndaro Valley at 1921 m.a.s.l, with at least 650 mm of rain. It is sensitive to drought, and it is used mainly in tortillas, tlacoyos (small toasted cakes), pinole (a corn-based flour), atole (a hot corn-based beverage), gorditas (small filled pastry), roasted corn and as pigments principally for anthocyanin (Arellano *et al.*, 2003; Urias-Peraldí *et al.*, 2013).

Espada. Nothing could be found in the literature about this variety, although it was purchased in a specialized store selling diverse seeds, such as maize, sorghum, bean, and wheat. The store is called “El Purepecha” and is located on Guillermo Prieto Numero 3, Álvaro Obregón, Michoacán, México, CP. 58920.

Insects

Larvae of *S. frugiperda* were obtained from a laboratory culture reared on a semi-synthetic diet before herbivory. Adults were fed with 15% honey water solution (Poitout and Bues 1974). Larvae of *P. vetula* were collected from crops of the locality Zacapu belonging to the state of Michoacán (19° 49' 57" N and 101° 43' 21" W), where this beetle is the dominant species. Larvae were kept in quarantine for three weeks in peat moss in order to discard sick larvae. In addition, they were fed with pieces of carrot in the laboratory until their experimental use.

Experimental design

Two greenhouse pot experiments were performed to investigate the response of maize genotypes to foliar herbivory from *S. frugiperda* (experiment 1) and root herbivory from *P. vetula* (experiment 2).

Experiment one: Foliar herbivory with *S. frugiperda*

The experiment had a completely random factorial design with two factors: factor 1) Maize genotypes (5 landraces and 5 hybrids, mentioned in the biological materials) and factor 2) *S. frugiperda* (presence and absence). The growth substrate was sterile soil in order to evaluate the maize genotype performance without the effect of root associated microorganisms.

Experiment two: Root herbivory with *P. vetula*

The experiment had a completely random factorial design with two factors: factor 1) Maize genotypes (5 landraces and 5 hybrids, mentioned in the biological materials) and factor 2) *P. vetula* (presence and absence). In this experiment unsterile soil was used since it would be difficult to maintain comparable soil microbial communities in treatments with and without *P. vetula*.

In both experiments each treatment had six replicates, resulting in a total of 120 experimental units (10x2x6). The two experiments were performed in parallel, but with two weeks interval between sowing.

Experimental setup

Both experiments were conducted in a greenhouse, in pots with a capacity of 1.5 L and with 1.2 Kg of soil:sand mix (1:1, w:w). The soil sterilization, for experiment one was performed in an electric sterilizer (Pro-Grow model SS-30) at a temperature of 180 °C for 72 h. Three seeds were

planted to assure germination, leaving them for 10 days, when seedlings were thinned to leave only one plant per pot. Watering was done on a daily basis to maintain 80 % of the water holding capacity.

In experiment one, five *S. frugiperda* L₂ larvae were placed in each plant and left to feed for two weeks. All the plants were covered by a fine mesh of tergal fabric with 0.2 mm of opening between the pinholes so that the insects were confined. In experiment two three L₂ larvae of *P. vetula* were placed on top of the soil and left to feed in roots for two weeks. Eight weeks after sowing foliar herbivory with *S. frugiperda* was measured according to six damage categories of damage 1, 2, 3, 4, 5, 6 (0, 1-5, 6-12, 13-25, 26-50, 51-100% of damage respectively) proposed by Dirzo and Domínguez (1995), and the insects were collected and weighed. Immediately hereafter, plants were harvested, by separating the aerial part from the radical part. The plants (the aerial and radical parts) were dried in an oven (of the Fisher Scientific® brand) at 80 °C for 72 h, for later being weighed in an Ohaus® brand analytical balance. The plants of phase b that contained *P. vetula* were harvested at 10 weeks, and the aerial part was dried in the same way as described before. Nevertheless, their roots were stored in a freezer at -20 °C.

Staining and mycorrhizal quantification

The roots from experiment two were weighed fresh, and homogenized; furthermore, approximately 2 gr were collected to evaluate the percentage of mycorrhizal colonization. The remainder of the roots was dried in an oven at 80°C for 72 hours. Afterward 2 g were stained with trypan blue (Phillips and Hayman, 1970). The roots were washed, until the elimination of the soil residues; they were then cut into approximately 1-cm fragments and stirred in water until all the fragments remained homogenized. Subsequently, KOH at 10% was added to the sample and heated in a double boiler at 70°C for 15 minutes. The roots were then rinsed to remove all traces of potassium hydroxide, and hydrogen peroxide was added (H₂O₂), letting the roots become lighter for 30 minutes. Immediately the oxygenated water was decanted, and trypan blue at 0.05% was added until the roots were covered. In addition, they were placed in a double boiler for 10 minutes at 70 °C. Later the excess of trypan blue was removed; they were then rinsed and placed in tubes, and glycerin was added to them (C₃H₈O₃) until the root was completely covered. The stained roots were observed and quantified in an AmScope® *stereoscope with the method proposed by Giovannetti and Mosse (1980). The total root length was determined by the line intercept method (Newman, 1966).

Statistical analysis

The experiments were analyzed with a one-way and two-way ANOVA, the categories of damage, with a Kruskal-Wallis variance analysis. The assumption of normality was performed with the Shapiro-Francia test to verify the normality and the Bartlett test for the homogeneity of variance. When the data did not fulfill the assumption of normality or homoscedasticity of the variance, the data were transformed through a natural logarithm or by square root. The percentage of mycorrhizal colonization was converted through an angular transformation. The performed post hoc analyses were Fisher's LSD test (low significant difference), and for the damage categories the Dunn test was used. All the analyses had 95% confidence. The statistic packages used were as follows: Statgraphics Centurion 15.2 of the StatPoint® company, the Minitab 16.1 program of the Minitab® company, the a Gnumeric 1.10 spreadsheet and Microsoft Excel as a database.

Results

Experiment one

Shoot and root dry weight

Insects had a significant effect on shoot dry weight (Table1), plants attacked by *S. frugiperda* showed a lower dry weight than plants without *S. frugiperda* (Fig. 1a). On the other hand, the variety factor did not show significant differences nor was any interaction found. When the type of maize was analyzed (native versus hybrid), no differences were found either. Similar results were observed for root dry weight, root dry weight in plants with *S. frugiperda* were lower than control plants (Table 1, Fig. 1b). No single factor effects with the factor “maize genotype” nor interactions between factors were observed. When testing the type of maize genotype also no significant effects were observed.

Larval weight of S. frugiperda and herbivory

Larvae feeding on plants for two weeks demonstrated significant differences depending on maize genotype (Table 1), where larvae feeding on Elotes Occidentales genotype had the highest weight and in contrast larvae feeding on DK-2061 variety had a lower weight (Fig. 1C). In general, insects feeding on landrace maize genotypes showed a higher larval weight than those that feeding on hybrid maize genotypes (Fig. 1D).

Also, for herbivory differed between maize genotypes (Table 1). While Azul and Espada genotypes showed greater damage, the commercial hybrids like PUMA, NB9 and DK-2061 had less damage (Fig. 1E). The analysis for maize type also showed that landrace genotypes had significantly less damage than the hybrids (Fig. 1F, Table 1).

Experiment two

Shoot and root dry weight

Maize genotypes showed differences in shoot weight, the Dulce and Espada genotypes had the highest shoot dry weight, whereas the lowest shoot dry weight was observed for PUMA (Fig. 2A, Table 1). *P. vetula* effect was evident in a lower root dry weight in plants with the insect compared to control plants (Table 1, Fig. 2B). For the root/shoot ratio significant individual “insect” and “maize genotype” effects were observed (Table 1), where plants with *P. vetula* had higher root/shoot ratio than plants without *P. vetula* (Fig. 2C) and also a higher root/shoot ratio was found for hybrid maize than in landrace maize (Fig. 2D).

AMF root colonization and total and specific root length

For AMF root colonization no significant effects were observed (Table 1), but in general AMF root colonization was in the range 60-70 %. A significant “maize genotype x insect” interaction was observed for total root length (Table 1), where *P. vetula* reduced the root length of the genotypes Elotes Occidentales and PUMA, but had no effect on the other maize genotypes examined (Fig. 3)

Discussion

Maize genotypes including landraces and hybrids respond differentially to both foliar and root feeding insects. Our main hypothesis that landrace maize is more resistant to insect herbivory was partially confirmed since this was true for foliar but not for root herbivory.

Response of maize genotypes to foliar herbivory

The maize varieties behaved differently when confronted with herbivorous insects, with a higher level of herbivory in the landrace genotypes than the hybrids. This contrast to the general idea that the intensive domestication of maize has had as a consequence of a greater susceptibility to herbivorous insect in comparison with their wild ancestors, which had been established in diverse crops (Rosenthal and Dirzo, 1997; Bellota *et al.*, 2013; García-Montalvo, 2016), because of an imbalance between competition and defense (Smith, 1989; Gepts, 2010). Along this line, Szczepaniec *et al.* (2013), examined *S. frugiperda* herbivory in maize compared to that of the wild ancestor teocintle, reporting that maize expressed low levels of genes from the majority of genes related to defense and, in contrast, the teocintle expressed high levels of those genes. Furthermore, Lange *et al.*, (2014) mentioned that teocintle has a higher tolerance and/or resistance to a greater number of pests, in comparison to that of maize. Nevertheless, in this work no measurement of defense was quantified, neither physical nor chemical, this aspect warrants further investigation.

Our finding that the hybrid maize showed less damage from herbivory, suggest that these genotypes are more resistant to foliar herbivory from *S. frugiperda* than landrace maize here examined. This lower damage to herbivory in hybrid maize coincided with a corresponding lower larval weight. Some of the hybrid genotypes (PUMA, CRM-52 and DK-2061) are from subsidiary companies of Monsanto®. Possibly, they have been produced through intensive crosses until reaching the most resistant to insect attacks. The Center of Validation and Technological Transference of Sinaloa (CVTTS for the Spanish abbreviation), in evaluating the characteristics of various hybrids recommended by the towns of Culiacan and Navolato in the state of Sinaloa, stated that the PUMA variety was one of those that had more resistance to and tolerance of *S. frugiperda*.

On the other hand, Llamas (2016) tested various maize genotypes, both landraces and hybrids and overall found differences in the expression of defensive mechanisms (resistance and tolerance) in both landrace and hybrid maize genotypes. However, Llamas (2016) only used commercial varieties, which came from the germplasm of the National Institute of Forestry, Agricultural and Fishing Research (INIFAP in its Spanish abbreviation). It is known that the commercial hybrids of this Institute come from maize that until recently was considered native and therefore still have not had sufficient time for conventional breeding. In the present study, the variety H-318 seems to behave like a hybrid when it is attacked by *S. frugiperda*. It is likely that this variety is a line recently released by INIFAP and is likely to behave more like a landrace maize than a hybrid one.

Furthermore, it is known that landrace maizes have high genetic variability, that is translated into low productivity, with low kernel yield, higher susceptibility to disease, weak stalks and roots, and is inadequate for sowing in a high population density (Castillo, 1993; MasterGonzález-Huerta *et al.*, 2007; Carrera-Valtierra *et al.*, 2011).

In the present study, foliar feeding by *S. frugiperda* not only impacted shoot dry weight but also root dry weight. This is in accordance with the model proposed by Masters *et al.*, (1993) that foliar herbivory may also result in reduction in root development, and possibly also modify the structure of the soil organisms. However, in the present study the soil substrate was disinfected to avoid interfering effects from associated rhizosphere microorganisms.

Response of maize genotypes to root herbivory

The observed reduction in root dry weight by root herbivory from *P. vetula* was independent from maize genotype indicate that root feeding occurred during the experimental time. This is further

supported from the results on root length, where root herbivory by *P. vetula* reduced the root length of two out of the ten maize genotypes examined, suggesting that some maize genotypes are attacked by *P. vetula* more than others. However, few larvae were recovered at harvest suggesting that larvae died during the experimental feeding phase. Moreover, since we cannot account for the time that the larvae were actively feeding on the roots, these results should be seen as preliminary, and more experiments are needed to make adequate comparisons between maize genotypes. Most likely, larvae died because of the excessive heat in the greenhouse, which on occasion exceeded 35 °C. The larvae, originating from Ciénega de Zacapu, which is a much colder area, did not acclimate themselves to the greenhouse heat, and the majority did not survive the full experimental period.

On the other hand, root herbivory did not show effects on shoot growth. In the present experiment, maize plants were not limited in nutrients nor water, why root feeding did not overall affect shoot growth. These results are in accordance to Blossey and Hunt-Joshi (2003) showing that effects of herbivory are less pronounced when plants are not limited in resources. It is also important to consider that in this experiment, unlike the experiment with *S. frugiperda*, the soil used was unsterilized soil with microorganisms, among them the AMF. In addition, it is known that the AMF, by providing better nutrition to the plant, minimize the herbivory effects and can induce a higher tolerance and better adaptation (fitness) for the reproduction of this (Garrido *et al.*, 2010; Currie *et al.*, 2011; Borowitz, 2013). On the other hand, root feeding had no effect on AMF root colonization, which is in contrast to Zitalpopoca *et al* (2017), who reported that root herbivory from *P. vetula* reduced AMF root colonization. In this sense, in an interesting review about herbivorous insects of the soil, Blossey and

Hunt-Joshi (2003) emphasize the difficulty involved in observing, measuring and handling an experimental system when one works with soil insects, given that observation and direct manipulation are impossible without creating disturbances or even destruction. On the other hand, this work was carried out in the vegetative stage, and it is likely that in the long term the differences between genotypes were different, for example, for grain production. Therefore, it is necessary to carry out work where the whole life cycle of corn is included.

Conclusion

The main general conclusion from the present study is that the response of maize to herbivory depends on maize genotype and type of plant organ exposed to herbivore insects. For foliar

herbivory landrace maize were more susceptible than hybrid maize, whereas for root herbivory no clear difference between these types of maize genotypes were observed.

References

- Arámbula, V. G., Méndez, A. A., González, H. J., Gutiérrez, A. E. y Moreno, M. E. 2004. Evaluación de una metodología para determinar characteristics de textura de tortilla de maize (*Zea mays* L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(2): 216-222.
- Arellano V., J.L., C. Tut C., A.M. Ramírez, Y. Salinas M., O.R. Taboada G. 2003. Maize Azul de los Valles Altos de México. I. Rendimiento de grano y caracteres agronómicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26: 101-107.
- Bellota, E., Medina, R. F., & Bernal, J. S. (2013). Physical leaf defenses—altered by *Zea* life-history evolution, domestication, and breeding—mediate oviposition preference of a specialist leafhopper. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 149(2), 185-195.
- Blossey, B., & Hunt-Joshi, T. R. (2003). Belowground herbivory by insects: influence on plants and aboveground herbivores. *Annual Review of Entomology*, 48(1): 521-547.
- Borowicz, V. A. (2013). The impact of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth following herbivory: a search for pattern. *Acta oecologica*, 52: 1-9.
- Carrera-Valtierra. J. A., Ron, P. A. Sánchez, G. J. J., Sahagún, C. L. y Márquez, S. F. 2010. Diversidad y conservación *in situ* de los maíces criollos de Michoacán. En: Seefoó, L. J. L. y Keilbach, B. N. (Eds). *Ciencia y paciencia campesina. El maize en Michoacán*. El Colegio de Michoacán pp 57-72.
- Carrera-Valtierra, J. A., Parra, R. J., Sánchez, G. J. J., Jiménez, C. A. A., Márquez, S. F., Sahagún, C., Sesmas, G. J. J. and Sitt, M. M. (2011). Integración del conocimiento tradicional en el mejoramiento de los maíces criollos de Michoacán. Centro Regional Universitario Centro Occidente de la Universidad Autónoma de Chapingo. First edition pp. 102.
- Cassidy, E. S., West, P. C., Gerber, J. S., & Foley, J. A. (2013). Redefining agricultural yields: from tonnes to people nourished per hectare. *Environmental Research Letters*, 8(3), 034015.
- Castillo, G. F. (1993). La variabilidad genética y el mejoramiento de los crops. *Ciencia*. Número especial: 69-19.
- Castillo, G. F. (2004). Contribuciones de los recursos fito genéticos a la genotecnica. En: Preciado, R. R. E. and Ríos, S. A. R. (eds.). *Simposium Aportaciones de la Genotecnica a la Agricultura*. XX Congreso Nacional de Fitogenética. Toluca Edo. de México. pp. 159.

- Castro-Ramírez, A. E. and Ramírez-Salinas, C. (2010). Gallinas ciegas en Chiapas. In Rodríguez, B. I. A. and Morón, M. A. (eds). *Plagas del Suelo*. COLPOS, INIFAP, UACH México pp. 313-336.
- CB, (2015). Varieties de maize para el Bajío, CRM-28, CRM-52 y CRM-54. Folleto técnico pp. 6. <http://www.monsantoglobal.com/global/lan/productos/pages/cb.aspx> Consultada el 25 de marzo de 2018.
- Currie, A. F., Murray, P. J., & Gange, A. C. (2011). Is a specialist root-feeding insect affected by arbuscular mycorrhizal fungi? *Applied Soil Ecology*, 47(2): 77-83.
- Dirzo, R. and Domínguez, C. A. (1995). Plant-herbivore interactions in Mesoamerican tropical dry forest. En: Bullock, S. H., Mooney H. A. y Medina, E. (Eds.). *Seasonally Dry Tropical Forest*. Cambridge University Press. pp. 304-325.
- Doebley, J. F. 2004. The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics* 38: 37-59.
- Farias, R. L. A., Hernandez, M. L. H., Molina, O. J., y Pescador, R Al. 2003. Effect of leaf extracts of teosinte, *Zea diploperennis* L., and a mexican maize variety, criollo ‘uruapeño’, on the growth and survival of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist* 86(3): 239-243.
- García-Montalvo, I. A. (2016). Mecanismos de resistencia a patógenos e insects herbívoros en teosinte y maize. *Journal of Negative and No Positive Results: JONNPR*, 1(5), 190-198.
- Garrido, E., Bennett, A. E., Fornoni, J., and Strauss, S. Y. (2010). Variation in arbuscular mycorrhizal fungi colonization modifies the expression of tolerance to above-ground defoliation. *Journal of Ecology*, 98(1):43–49.
- Fernández-Aulis, M. F. (2012). Aplicación de tecnologías emergentes para extracción óptima de antocianinas del totomoxtle y olote de maize criollo morado. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gepts, P. (2010). Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant breeding reviews*, 24(Part 2): 1-44.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84(3): 489-500.
- González-Huerta, A., Vázquez-García, L. M., Sahagún-Castellanos, J., Rodríguez-Pérez, J. E., & Pérez-López, D. D. J. (2007). Rendimiento del maize de temporal y su relación con la pudrición de mazorca. *Agricultura técnica en México*, 33(1): 33-42.

- IRRI and CIMMYT International Rice Research Institute (IRRI) and International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT). (2008). Cereal Knowledge Bank (available at <http://www.knowledgebank.irri.org>).
- Kato, A., Ortega, P. R., Boege, E., Wegier, A., Serratos, H. A., Alavez, V., Jardón-Barbolla, L., Moyers, L., and Ortega, D. V. D. (2013). Origen y diversidad del maíze. In Álvarez-Buylla, E. R. and Piñero, N. A., editors, *El Maíze en peligro ante los transgénicos. Un análisis integral sobre el caso de México*, Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades: Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad, first edition pages 15–24.
- Hellin, J., & Keleman, A. (2013). Las variedades criollas del maíz, los mercados especializados y las estrategias de vida de los productores. *LEISA Revista de agroecología*, 29(2), 9-14.
- Lange, E. S., Balmer, D., Mauch-Mani, B., & Turlings, T. C. (2014). Insect and pathogen attack and resistance in maize and its wild ancestors, the teosintes. *New Phytologist*, 204(2), 329-341.
- Llamas, G. L. P. (2016). Expresión de la resistencia y tolerancia en variedades de maíze nativo y comercial ante el daño causado por el herbívoro generalista *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera: Noctuidae). Master's thesis, Universidad Nacional Autónoma de México.
- León, D. C. (2010). Enfermedades importantes en el maíze. En: Rodríguez, M. R. y León, D. C. (Eds.). *El crop del maíze*. Temas Selectos. Colegio de Postgraduados pp. 46-62
- Martínez, R., Tadeo, M., Del Valle, A. P., Espinosa, A., & Solano, A. M. (1999). Rendimiento de nuevos híbridos pumas de maíze para la zona de transición de México. *Agronomía Mesoamericana*, 10, 73-76.
- Masters, G. J., Brown, V. K., & Gange, A. C. (1993). Plant mediated interactions between above- and below-ground insect herbivores. *Oikos*, 148-151.
- Melendez, P. C. O., Quintero, R. A., Ruiz, G. M. G. y Camacho, D. A. 2014. Del maíz a la tortilla: nixtamalización. *Synthesis Digital*. Revista electrónica de la Universidad de Chihuahua 1: 37-39
- Mera, O. L. M. y Caballero, N. J. (2010). Importancia del maíze en Mesoamérica a partir de las representaciones prehispánicas. En: De León, C. y Rodríguez, M. R. (Eds.). *El crop del maíze-tema selecto II*. Colegio de Postgraduados pp. 61-76
- MILPAL Semillas. (2015). http://www.semillasmilpal.com.mx/producto_h-318.html Consultada el 27 de marzo de 2018.

- MONSANTO, Monsanto global (2018). http://www.monsantoglobal.com/global/lan/productos/Documents/regions/dekalb/Bajio_MaicesWeb_Baja.pdf Página consultada el 24 marzo de 2018.
- Morón, M. A. 2010. Diversidad y distribución del complejo grub worm (Coleoptera: Scarabaeoidea). En: Rodríguez, B. L. A., y Morón, M. A. (Eds.). *Plagas del Suelo*. pp. 41-64
- Newman, E. I. (1966). A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of applied Ecology*, 139-145.
- NOVASEM Innovaciones S.A. de C.V., (2017). <http://novasem.com.mx/pdf/NB9.pdf> (Consultada el 24 marzo de 2018).
- Pérez-Constantino, A. (2015). Insects fitófagos asociados a maíces criollos de San Juan Ixtenco, Tlaxcala. Master's thesis, Postgrado en fitosanidad. Entomología y Acaralogía. Colegio de Postgraduados.
- Phillips, J. M., and Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*, 55(1), 158-161.
- Pogue, M. G. 2002. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 43: 1-202.
- Poitout, S., & Bues, R. (1974). Elevage de chenilles de vingt-huit espèces de Lépidoptères Noctuidae et de deux espèces d'Arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de l'élevage selon les espèces. In *Annales de zoologie: Ecologie animale*.
- Rosenthal, J. P. and Dirzo, R. (1997). Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: evidence from maizes and wild relatives. *Evolutionary Ecology*, 11(3):337–355.
- Ruíz-Ramírez, S., Ramírez, D. J. L., Ledesma, M. A., Hernández, V. R. and Ramírez, Z. R. (2014). H318. Híbrido de maíze de grano blanco para condiciones de riego y buen temporal para la zona centro occidente de México. Folleto técnico. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro De Investigación Regional Pacífico Centro. Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco. Numero. 2.
- Salazar, A. H. C. and Godínez, G. M. M. (2010). El maíze y sus usos estratégicos. In León, D. C. and Rodríguez, M. R., editors, *El crop del maíze - Temas selectos II*, pages 35–48. Colegio de Postgraduados.

- Salinas-Moreno, Y., Pérez-Alonso, J. J., Vázquez-Carrillo, G., Aragón-Cuevas, F., and Velázquez-Cardelas, G. A. (2012). Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas chalqueño, elotes cónicos y bolita. *Agrociencia*, 46(7):693–706.
- Sánchez G.J.J. 2011. Diversidad del Maize y el Teocintle. Informe preparado para el proyecto: “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Manuscrito pp. 98.
- Smith, C. M. (1989). *Plant resistance to insects. A fundamental approach*. John Wiley and Sons Ltd.
- Szczepaniec, A., Widney, S. E., Bernal, J. S. y Eubanks, M. D. 2013. Higher expression of induced defenses in teosintes (*Zea* spp.) is correlated with greater resistance to fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 146(2): 246-251
- Urias-Peraldí, M., Gutiérrez-Urbe, J. A., Preciado-Ortiz, R. E., Cruz-Morales, A. S., Serna-Saldívar, S. O., & García-Lara, S. (2013). Nutraceutical profiles of improved blue maize (*Zea mays*) hybrids for subtropical regions. *Field crops research*, 141, 69-76.
- Wellhausen, E. J., Roberts L. M. and Hernández E. X. (1951). Razas de maiz en México; origen, characteristics y distribución. Folleto Técnico No. 5. Oficina de Estudios Especiales, Secretaria de Agricultura y Ganadería. México. pp. 239.
- Zitlalpopoca-Hernandez, G., Najera-Rincon, M. B., del-Val, E., Alarcon, A., Jackson, T., and Larsen, J. (2017). Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Soil Ecology*, 115, 38-43.

Table 1. P values of the multifactorial analyses of variance (ANOVA) for the two phases, with the main factors: Variety (10 varieties previously described), Insect (with the presence and absence of *S. frugiperda*) and the *Variety x Insect* interaction. In addition, the Type of maize is analyzed (5 hybrids versus 5 criollos). For all the measured variables ($n = 6$). The degrees of freedom for all the individuals and their interactions $Df = 1$. In the categories of damage, a nonparametric variance analysis was used (Kruskal-Wallis).

<i>S. frugiperda</i>	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g) (log)	Biomass (g)	Root/Shoot dry weight (g) (log)	Insects collected (log)	Insect weight (g)	Damage category
Type of maize	ns	ns	ns	ns	***	**	***
Variety	ns	ns	ns	ns	ns	*	***
Insect	***	***	***	ns	-	-	-
<i>Variety x Insect</i>	ns	ns	ns	ns	-	-	-

<i>P. vetula</i>	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Biomass (g)	Root/Shoot dry weight (g)	Specific length	Length (gram of soil) (cm)	Colonization (%)
Type of maize	***	ns	***	*	ns	ns	*
Variety	***	ns	***	***	ns	**	ns
Insect	ns	***	*	*	ns	*	ns
<i>Variety x Insect</i>	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns

* = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; ns = $P \geq 0.05$.

Figure legends

Fig. 1. Aerial (A) and root (B) dry weight in the insect factor, at eight weeks of maize growth. Insect weight in the variety factor (C) and for type of maize (D), after feeding on the plants for two weeks. Herbivory in the plant by herbivory from *S. frugiperda* in the variety factor (E) and for the type of maize (F), after being attacked for two weeks by the larvae. Figures: a and b ($n = 60$); d and f ($n = 30$); c and e ($n = 10$). Different letters indicate significant differences between treatments through the LSD test. In the damage categories by herbivory, the Dunn test was used.

Fig. 2. Averages and the standard error of the following are shown: A) Aerial dry weight and B) Root dry weight, after 10 weeks of growth. The root/shoot part coefficient in the insect factor (C) and in the type of maize (D). Different letters indicate significant differences between treatments through the LSD test. Figures: a ($n = 20$), b, c and d ($n = 60$); n = 6).

Fig. 3. Total root length by gram of soil, the +astericks show interaction between/among the factors. Different letters indicate significant differences between treatments through the LSD test.

FIGURE 1

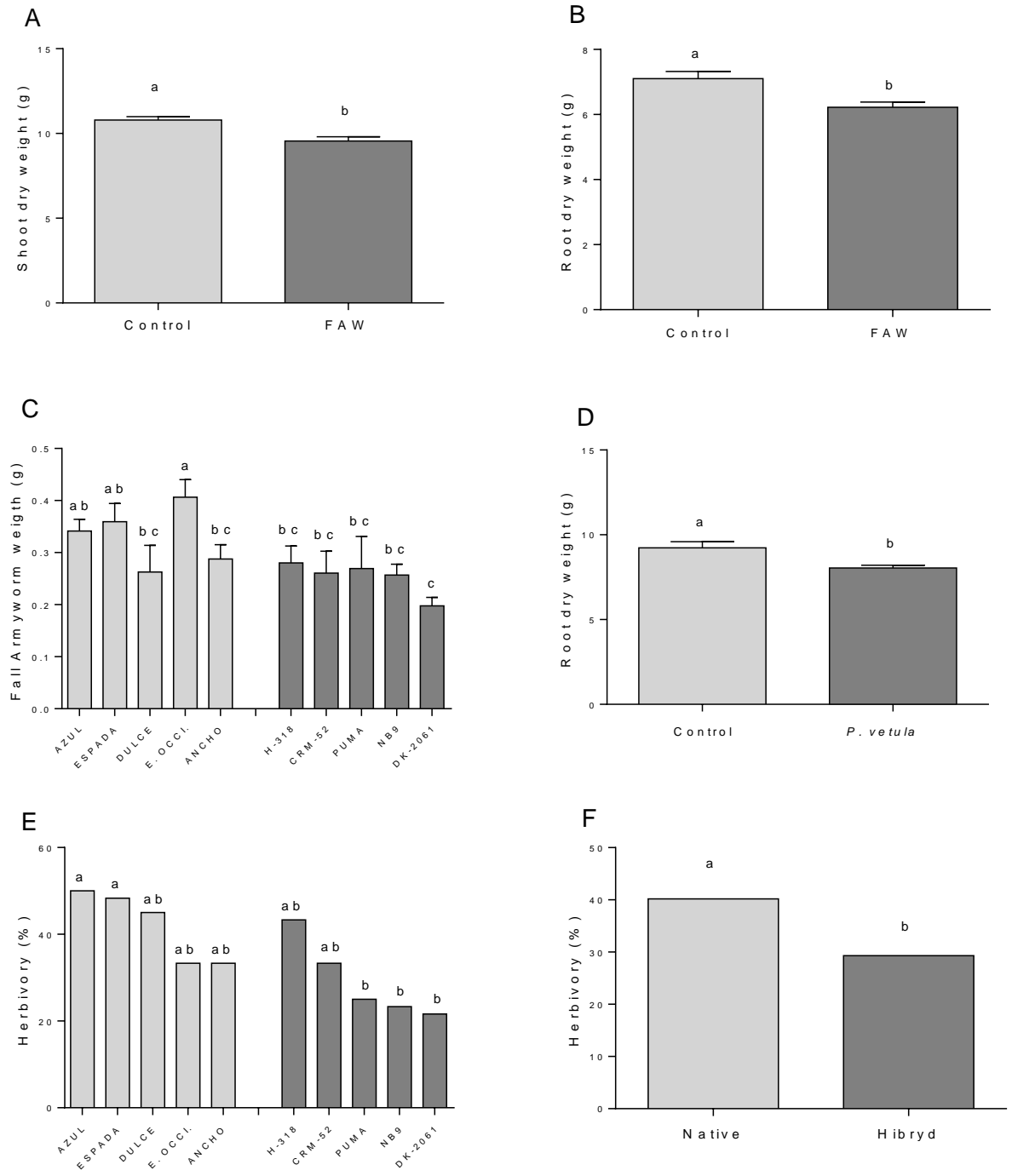


FIGURE 2

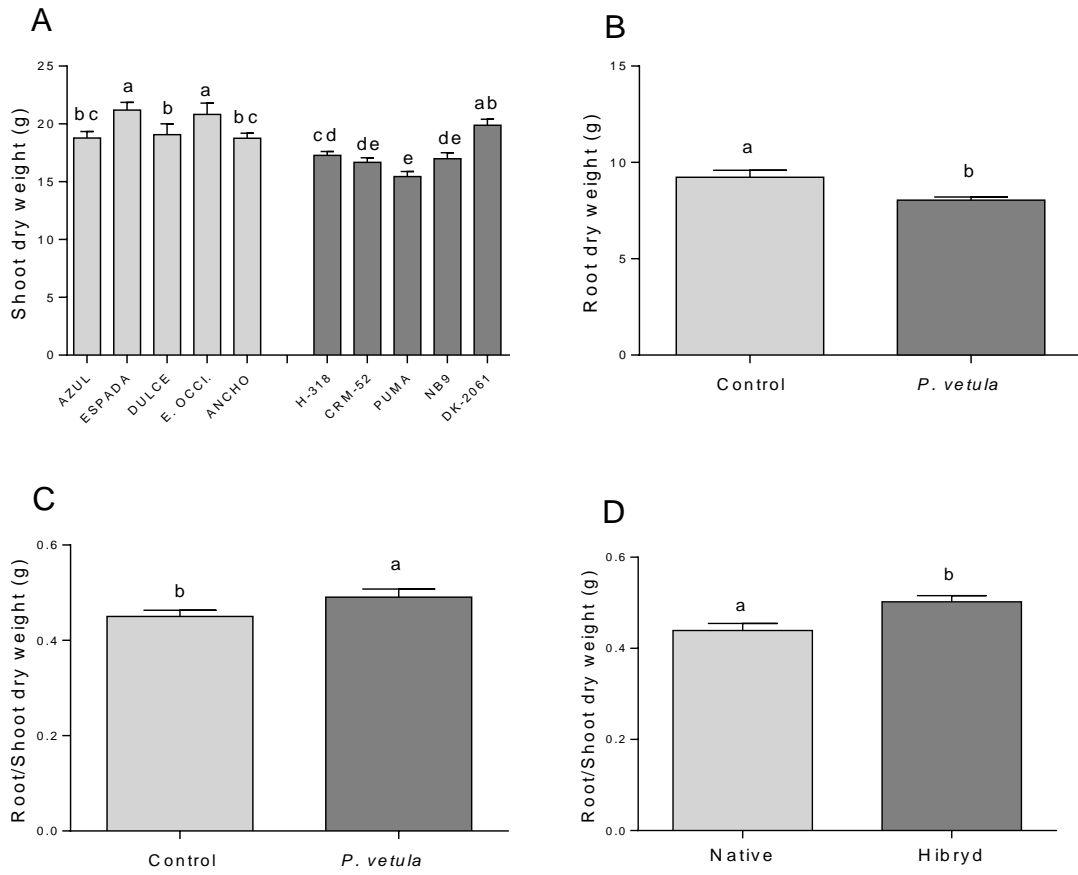
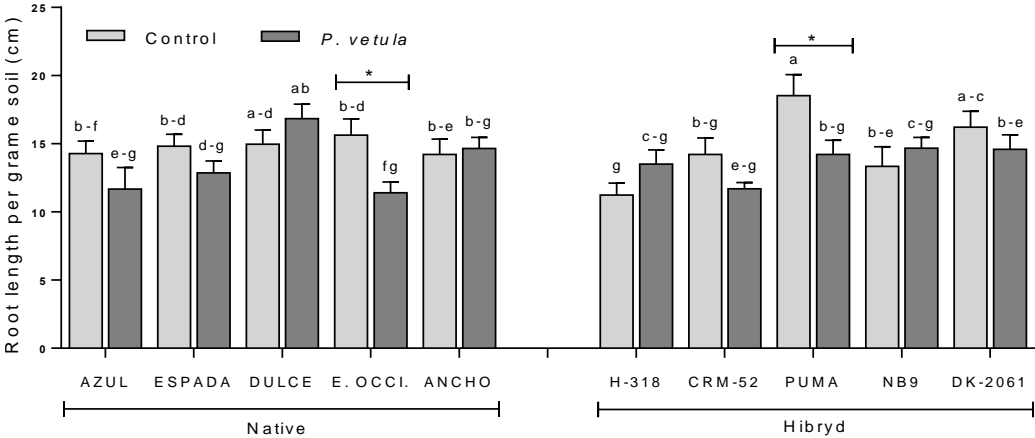


FIGURE 3



CAPÍTULO II

INCREASED MAIZE GROWTH AND P UPTAKE PROMOTED BY ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI COINCIDE WITH HIGHER FOLIAR HERBIVORY AND LARVAL BIOMASS OF THE FALL ARMYWORM *Spodoptera frugiperda*



Ofrendas de cañas verdes de maíz y de ocholli, el maíz para la siembra. Códice Florentino.



Increased maize growth and P uptake promoted by arbuscular mycorrhizal fungi coincide with higher foliar herbivory and larval biomass of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*

Raúl Omar Real-Santillán¹ · Ek del-Val^{1,2} · Rocío Cruz-Ortega³ · Hexon Ángel Contreras-Cornejo¹ · Carlos Ernesto González-Esquivel¹ · John Larsen¹

Received: 8 June 2019 / Accepted: 25 September 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Most plant species naturally associate with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which are known to promote crop nutrition and health in agroecosystems. However, information on how mycorrhizal associations affect plant biotic interactions that occur aboveground with foliar herbivores is limited and needs to be further addressed for the development of pest management strategies. With the objective to examine the influence of maize mycorrhizas on foliar herbivory caused by larvae of *Spodoptera frugiperda*, a serious pest in maize agroecosystems, we performed a fully factorial greenhouse pot experiment with three factors: Maize genotype (Puma and Milpal H318), AMF (with and without AMF, and without AMF with mineral P) and Insect herbivory (with and without *S. frugiperda*). Main results showed that inoculation with AMF improved plant growth and foliar P concentration, which coincided with increased foliar damage from herbivory and higher biomass of *S. frugiperda* larvae. A significant positive correlation between shoot P concentration and larval biomass was also observed. Finally, foliar herbivory by *S. frugiperda* slightly increased and decreased AMF root colonization in Puma and H318, respectively. In conclusion, our results show that maize plant benefits from AMF in terms of promotion of growth and nutrition, and may also increase the damage caused from insects by improving the food quality of maize leaves for larval growth, which seems to be linked to increased P uptake by the maize mycorrhizal association.

Keywords Agroecology · Multitrophic interactions · Arbuscular mycorrhizal fungi · Foliar herbivory · Phosphorus

Introduction

Maize is one of the basic cereal crops produced worldwide, used mainly for human consumption, livestock fodder, and bioenergy

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00572-019-00920-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ John Larsen
jlarsen@cieco.unam.mx

¹ Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM, Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701 Col. Ex-hacienda de San José de La Huerta C.P. 58190 Morelia Michoacán Mexico

² Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia, UNAM, Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701 Col. Ex-hacienda de San José de La Huerta C.P. 58190 Morelia Michoacán Mexico

³ Instituto de Ecología, UNAM, Circuito Exterior S/N anexo Jardín Botánico exterior Ciudad Universitaria C.P. 04500 Ciudad de México Mexico

(Bennetzen and Hake 2009). Insect pests, including the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), are among the most production-limiting factors in maize agroecosystems (Pedigo and Rice 2009). Pest management of includes chemical and biological control, cultural practices, and crop system diversification (Pedigo and Rice 2009). Independent of the pest control strategy, it is important to consider employing an agroecological approach taking into consideration how other plant biotic interactions influence insect pest management (Altieri and Nicholls 2004).

Manifold direct and indirect plant biotic interactions at different trophic levels take place in agroecosystems (Médiène et al. 2011), which are all important for insect pest management (Altieri and Nicholls 2004). Among such plant biotic interactions, the symbiotic association between roots of most plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is a key one to consider since it can strongly alter host plant phenotype such as primary and secondary metabolism, nutrient concentration and defense (Smith and Read 2008), thereby indirectly modifying plant–herbivore interactions.

Maize naturally associates with AMF, which has been shown to result in improved plant growth and P nutrition with single AMF species (Sarabia et al. 2018) and field communities of AMF (Sarabia et al. 2017; Zitalpopoca-Hernandez et al. 2017; Alvarado-Herrejón et al. 2019). However, the phenotypic plant response to AMF depends on maize genotype (Sawers et al. 2017) and agricultural practices such as fertilization (Sarabia et al. 2017; López-Carmona et al. 2019) and tillage (Gavito and Miller 1998). Plant stress alleviation from abiotic and biotic stress is another key feature related to arbuscular mycorrhizas (Kumar and Verma 2018). Alleviation of biotic stress from plant pests including microbial plant pathogens (Whipps 2004; St-Arnaud and Vujanovic 2007; Veresoglou and Rillig 2012) and arthropod herbivores (Gange 2007; Gehring and Bennett 2009; Koricheva et al. 2009) by arbuscular mycorrhizas has been linked with both induction of systemic resistance (Pozo and Azcón 2007; Mauch-Mani et al. 2017) and improved tolerance from resource compensation (Garrido et al. 2010; Ramírez Gómez and Rodríguez 2012; Zitalpopoca-Hernandez et al. 2017).

Results from a meta-analysis showed that the influence of mycorrhizal associations on the performance of arthropod herbivores depends on the type of herbivore, with reduced and increased damage from chewing and piercing-sucking herbivores, respectively (Koricheva et al. 2009). Foliar arthropod pests might also interact with AMF, as herbivory can alter the allocation of plant photosynthates to the roots (Gange 2007; Gehring and Bennett 2009; García-Rodríguez et al. 2012; Machado et al. 2013). However, the general knowledge of interactions between arbuscular mycorrhiza and foliar arthropod herbivores is still limited. Most studies have been performed with single species of AMF, with detached leaves, and have focused on plant defense responses.

Hence, the objective of this work was to investigate the interactions between a field community of AMF associated with maize and the insect herbivore *S. frugiperda* in vivo focusing on the possible role of P in this multitrophic interaction. We tested the main hypothesis that mycorrhizal maize plants compensate damage from foliar herbivory caused by *S. frugiperda* by improving plant P uptake.

Materials and methods

Experimental design

A multifactorial completely randomized design was employed with the following three factors: (1) Maize genotype (two levels—H-318 and PUMA), (2) Insect herbivory (two levels—with and without *S. frugiperda*), and (3) AMF (three levels—with and without AMF and without AMF but with P). Each of the 12 treatments ($2 \times 2 \times 3$) had five replicates, for a total of 60 experimental units.

Biological materials and substrate

The maize (*Zea mays* L.) hybrids PUMA (Asgrow®) and H-318 (Milpal®) were used in the present study as examples of maize genotypes commonly grown in the state Michoacán in Mexico. In a previous study, these hybrids were found to differ in response to herbivory from *S. frugiperda* with more herbivory and hence damage in H-318 than in PUMA (Real-Santillan O, unpublished data).

Larvae of *S. frugiperda* were obtained from a laboratory culture reared on a semi-synthetic diet before herbivory. Adults were fed with 15% honey water solution (Poitout and Bues 1974).

Soil was obtained from the experimental field station of the National Agricultural University of Mexico, Campus Morelia, Michoacán, Mexico. Soil texture was clayish (53.2% clay, 27.3% silt, and 19.5% sand) with the following chemical characteristics: organic matter = 2.7%, inorganic nitrogen = 23.2 mg kg⁻¹, plant available phosphorus (Olsen P) = 5.8 mg kg⁻¹, and pH (H₂O) = 7.3. Soil was mixed with quartz sand (1:1, w/w) and disinfected in an electric soil sterilizer at 90 °C for 24 h.

Plant nutrients were mixed into the soil (mg kg⁻¹ dry soil): K₂SO₄ (75.0), CaCl₂·2H₂O (75.0), CuSO₄·5H₂O (2.1), ZnSO₄·7H₂O (5.4), MnSO₄·H₂O (10.5), MgSO₄·7H₂O (45), Na₂MoO₄·2H₂O (0.18), and NH₃NO₄ (30). In the treatment with P, 100 mg pot⁻¹ P as KH₂PO₄ was mixed into the soil.

The field community of AMF in the maize field where the soil was collected, has been reported to be dominated by *Glomus* spp., *Acaulospora* spp., *Gigaspora* spp., and *Intraspora* spp. (López-Carmona 2013).

Experimental set-up

Soil sand mix (1:1, w/w) (1200 g) was added to each pot (1.5 L). In both treatments, “without AMF” disinfected soil was used, whereas in treatments “with AMF” 25% of the soil/sand substrate was non-disinfected and hence harbored the native field community of AMF and other microbiota. In the treatments “without AMF” and “without AMF with P,” soil microorganisms other than AMF were reestablished by adding 10 mL soil filtrate prepared by sieving a suspension of 100 g non-disinfected soil in 1 L distilled water through a nylon mesh (20 µm), which retained propagules of AMF, but allowed other microorganisms to pass. Prior to filtration, the soil suspension was mixed on a magnetic mixer for 2 h at 650 rpm.

The soil was watered to 80% of the water holding capacity. Three maize seeds were then sown in each pot with the different maize genotypes in their respective treatments. One week after seedling emergence, seedlings were thinned so that each pot contained only one seedling of similar size to minimize variation in plant development not related to the

experimental factors examined. During the entire 8-week plant growth period, pots were watered daily by weight to maintain 80% water holding capacity. Every second week, an additional 30 mg N were applied to each pot as a solution of NH_3NO_4 . Plants were grown under greenhouse conditions with 15–20 °C and 25–30 °C night and day temperatures, respectively.

Six weeks after sowing, three L_2 larvae of *S. frugiperda* were placed on a leaf toward the stem center in the treatments with insect herbivory. Prior to application of *S. frugiperda* larvae, plants of all experimental units both without and with *S. frugiperda* were individually covered with insect net (200 μm mesh) to confine larvae to their respective experimental unit. Larvae were left to feed for 2 weeks.

Harvest and analyses

The experiment was ended 8 weeks after sowing. Larvae were collected and weighed. The level of shoot herbivory was determined visually according to damage categories as described by Domínguez and Dirzo (1995) using the following levels of damage: 0 = no damage, 1 = 0–5% damage, 2 = 6–12% damage, 3 = 13–25% damage, 4 = 36–50% damage, and 5 = 51–100% damage. Hereafter, the shoot was separated from the root and the root system was washed free of soil. Roots were then cut into 5–10 mm segments and mixed in water to obtain a 2-g representative subsample from each experimental unit for measurement of AMF root colonization. Root subsamples were stored at –20 °C until processing. The shoot and the remaining roots were oven dried for 72 h at 80 °C. Dried shoots were milled and sieved with a 0.425-mm mesh for further analysis of shoot N and P concentration.

Measurement of AMF root colonization was performed with the root intersection microscopy method using a compound stereo microscope according to Giovannetti and Mosse (1980) after clearing and staining the roots according to Kormanik and McGraw (1982) except that trypan blue was used instead of acid fuchsin. Presence and absence of internal AMF structures including vesicles, arbuscules, and/or mycelium only within the line of intersection was scored for 100 root intersections and data presented as percentage AMF root colonization.

For P and N shoot analyses, shoot samples (0.25 g) were pre-digested at room temperature for 24 h in 75 mL glass tubes with 1 g CuSO_4 , 10 g K_2SO_4 , 3 mL H_2O_2 (30% v/v), and 7 mL sulfuric acid (H_2SO_4). For the final complete digestion, the tubes with the samples were placed in a digester block where temperature was gradually increased (50 °C every 20 min) to 375 °C for 3 h. The final digested mixture was filtered (filter Whatman No. 1, 125 mm) and measured by colorimetric reading at 660 nm in an autoanalyzer Braun+Luebbe III. Measurements of N and P were performed according to Bremner (1996) and Murphy and Riley (1962), respectively.

Statistical analyses

For the variables shoot and root dry weight, shoot N and P concentration, AMF root colonization, larval weight, and recovery, multifactorial parametric analysis of variance (ANOVA), including the factors “Maize genotype,” “Insect herbivory,” and “AMF,” was employed to test for significant effects of individual factors and their possible interactions. Prior to ANOVA, data were tested for variance homogeneity (Bartlett) and normality (Andersen–Darling). In order to meet variance homogeneity, data for shoot P concentration were Johnson transformed, data for shoot N concentration were square root transformed, and data for AMF root colonization were arcsine transformed. LSD post hoc tests were used for comparisons of treatment or factor means. For the variable herbivory damage, which was based on non-parametric range data, Kruskal–Wallis was employed for each of the factors “Maize genotype” and “AMF,” individually. All statistical analyses were performed with the Statgraphic Centurion XV 2.06 (Statpoint®) software.

Results

Only significant results for individual factors or interactions are presented but means and standard errors of all treatments from all variables measured are presented in Supplementary Table 1.

Shoot and root dry weight

Shoot and root dry weight showed significant effects from the “Maize genotype \times AMF” interaction (Table 1). Plants fertilized with P had the highest growth both in terms of shoot and root dry weight independent of maize genotype (Fig. 1a, b). Inoculation with the AMF field population caused shoot growth promotion compared to the control, although strongest with the genotype PUMA (Fig. 1a, b).

Shoot P and N concentration

For shoot P concentration, significant effects were observed for all three factors examined “Maize genotype,” “Insect herbivory,” and “AMF” although no interactions were significant (Table 1). The shoot P concentration was significantly higher in plants inoculated with AMF compared to the non-inoculated controls and plants fertilized with mineral P (Fig. 2a). The shoot P concentration was higher in PUMA (1.48 mg P g^{-1}) than in H-318 (1.33 mg P g^{-1}). Herbivory increased the shoot P concentration by 11.3% compared to that of plants without *S. frugiperda*.

Shoot N concentration showed a significant interaction effect of “Maize genotype \times AMF,” but no effect of herbivory (Table 1). The shoot N concentration in H-318 was unaffected by AMF inoculation and P fertilization but was reduced in

Table 1 Summary of linear model ANOVAs for all response variables for all individual factors and their interactions ($df=1, n=5$). Bold letters indicate significant effects

Variables	Maize genotype (M)		AMF (A)		Insect herbivory (I)		M × A		M × I		A × I		M × A × I	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Shoot dry weight (g)	0.01	0.940	106.6	<0.001	1.73	0.190	6.66	0.002	2.35	0.130	0.97	0.380	0.49	0.610
Root dry weight (g)	23.2	<0.001	117.7	<0.001	0.86	0.350	0.35	0.020	3.84	0.550	0.90	0.410	1.80	0.170
Nitrogen (mg g ⁻¹)	7.97	0.007	31.1	<0.001	0.24	0.620	11.1	<0.001	2.57	0.110	1.04	0.360	2.20	0.120
Phosphorus (mg g ⁻¹)	9.10	0.004	36.15	<0.001	8.26	0.006	1.00	0.370	0.30	0.580	0.92	0.400	0.97	0.380
AMF root colonization (%)	5.13	0.037	–	–	0.07	0.790	–	–	15.4	0.001	–	–	–	–
Fall Armyworm weight (g)	0.12	0.730	56.0	<0.001	–	–	0.10	0.910	–	–	–	–	–	–
Recovery larvae	0.06	0.810	20.4	<0.001	–	–	2.24	0.120	–	–	–	–	–	–
Herbivory (Kruskal–Wallis)	$H=23.55, df=5, p=0.000$													

PUMA by P fertilization compared to the treatment without AMF, and to the treatment with AMF, which also presented higher shoot N concentrations than in the corresponding treatments with H-318 (Fig. 2b).

AMF root colonization

A significant “Maize genotype × Insect herbivory” interaction was obtained for AMF root colonization (Table 1), which was

slightly reduced and increased by insect herbivory in the maize genotypes H-318 and PUMA, respectively (Fig. 3). Plants without AMF inoculation remained without mycorrhizas at harvest.

Herbivory, larval weight, and recovery of larvae

Herbivory, larval weight, and recovery of larvae were significantly affected by AMF (Table 1). Herbivory was highest

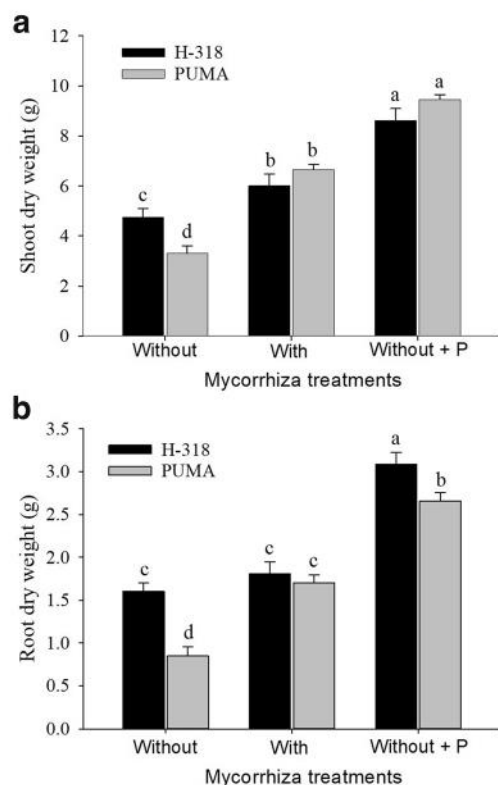


Fig. 1 Shoot (a) and root (b) dry weight means of the “Maize genotype × AMF” interaction ($n=10$) of 8-week-old maize plants. Bars topped by the same letter do not differ significantly by post hoc LSD test ($\alpha=0.05$). Error bars represent standard error of the mean

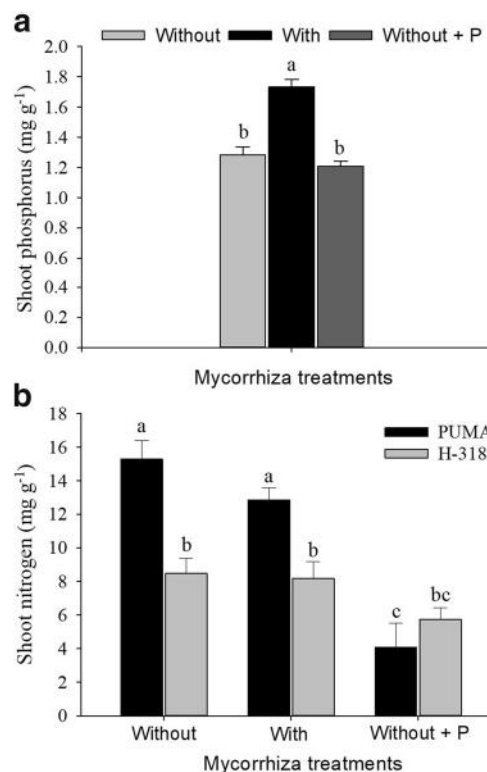


Fig. 2 Shoot P concentration (a) means of the factor “AMF” ($n=20$) and shoot N concentration (b) means of the “Maize genotype × AMF” interaction ($n=10$) of 8-week-old maize plants. Bars topped by the same letter do not differ significantly by post hoc LSD test ($\alpha=0.05$). Error bars represent standard error of the mean

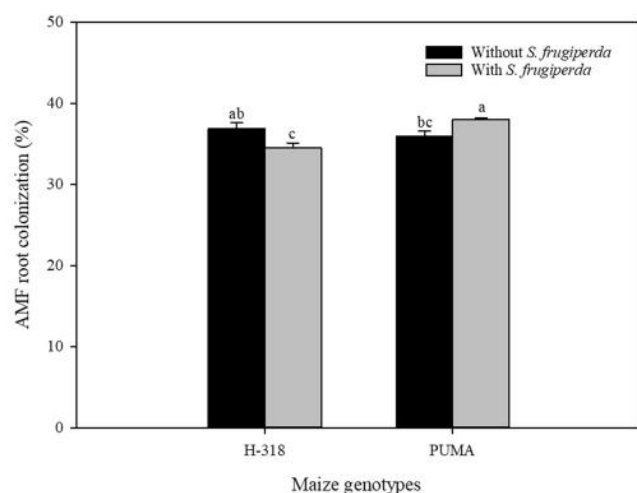


Fig. 3 AMF root colonization means of the “Maize genotype × Insect herbivore” interaction ($n = 10$) of 8-week-old maize plants. Bars topped by the same letter do not differ significantly by post hoc LSD test ($\alpha = 0.05$). Error bars represent standard error of the mean

with AMF, intermediate without AMF, and lowest without AMF with P fertilization (Table 2). The same pattern was observed for mean larval weight (Table 2) and recovery of larvae (Table 2) although with much stronger contrasts between the treatments without AMF and without AMF with P fertilization.

Significant positive correlations were observed between larval weight and shoot P concentration ($r = 0.70$, $P < 0.001$) (Fig. 4) and between larval weight and herbivory as damage categories ($r = 0.74$, $P < 0.001$) (Fig. 4).

Discussion

Arbuscular mycorrhizal fungi provide key ecosystem services in agroecosystems in terms of improved crop nutrition and health (Gianinazzi et al. 2010). However, here we show that such plant beneficial features of AMF in terms of improved foliar P concentration coincided with increased foliar damage from herbivores and higher biomass of *S. frugiperda* larvae. Nevertheless, increased herbivory in mycorrhizal plants did not result in reduced plant growth performance, confirming

Table 2 Factor treatment means of the factor AMF for the herbivore variables herbivory, larvae weight and recovered larvae

Herbivore variables	AMF treatments		
	–AMF	+AMF	–AMF + P
Herbivory index	2.3b	4.3a	0.2c
Larvae weight (mg)	17.8b	139.0a	0.3c
Recovered larvae	1.00b	2.30a	0.13c

Within each variable means followed by the same letter do not differ significantly by corresponding post hoc ANOVA test ($\alpha = 0.05$, $n = 10$)

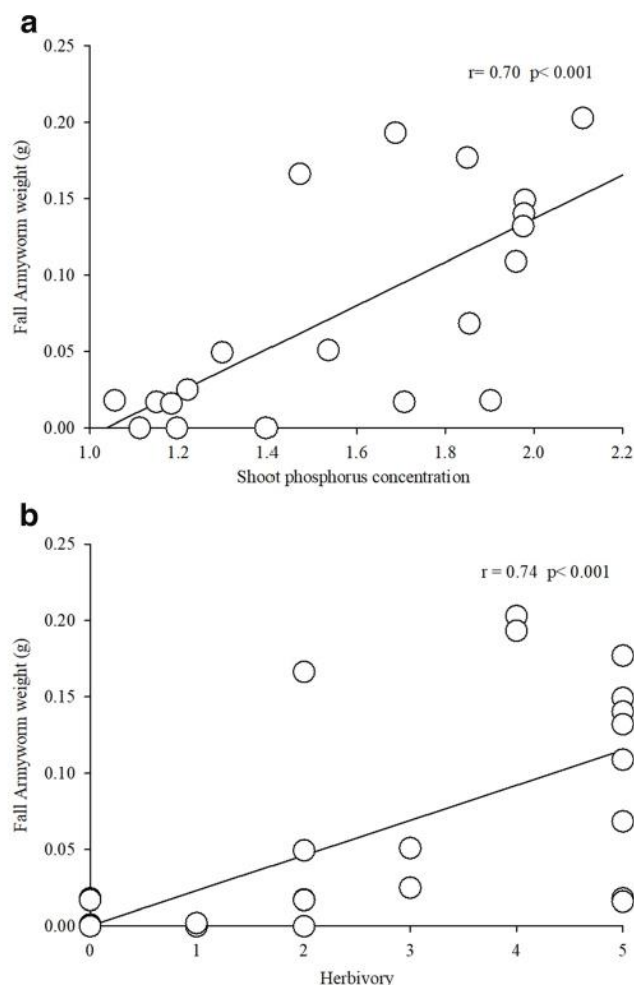


Fig. 4 Linear associations between larval weight and shoot P concentration (a) and larval weight and herbivory (b)

our hypothesis that AMF help to compensate damage from foliar herbivory, most likely by improving nutrient uptake.

The observed plant growth and shoot P promotion by native field communities of AMF is a common maize mycorrhiza response (Zitlalpopoca-Hernandez et al. 2017; Alvarado-Herrejón et al. 2019) although depending on maize genotype (Sawers et al. 2017) and agricultural practices such as fertilization (Sarabia et al. 2017; López-Carmona et al. 2019). The soil P level available for plant growth in the present study (7.3 mg P kg^{-1}) was below the critical soil P level recommended for maize growth, which has been reported to be $< 15 \text{ mg P kg soil}$ (Tang et al. 2009). When P is limiting plant growth as was the case in the present study, maize may benefit from associating with AMF principally in terms of plant growth promotion (Deng et al. 2017).

As was the case in the present study, effects of AMF on maize N acquisition seem to be less important than those on P. In scenarios with N deficiency, mycorrhiza plant growth suppression may even occur (López-Carmona et al. 2019). In a field experiment, competition for N between AMF and maize

was suggested to be responsible for an observed increase in kernel N concentration after elimination of the native AMF community by fungicide application (Wang et al. 2018). In the present study, when improving maize P acquisition, either induced by AMF or by application of mineral P to the sterile soil substrate, shoot N dilution occurred, suggesting that the mineral N application rate during maize growth was not enough to avoid N deficiency, though only statistically significant in the PUMA maize genotype.

S. frugiperda herbivory had no significant effect on the plant growth parameters examined, although herbivory tended to reduce shoot and root dry weight, and as expected, did so more markedly in the susceptible genotype H-318. However, mycorrhizal plants were subjected to higher levels of herbivory than non-mycorrhizal plants both with and without P fertilization. In sterile soil, herbivory was lowest in P fertilized plants. In addition, recovery of the larvae added to each plant was very low in non-mycorrhizal plants, but whether the larvae had died or escaped is unfortunately unaccounted.

The improved larval performance in mycorrhizal plants in terms of herbivory and biomass is opposite to the findings of Koricheva et al. (2009) reporting that arbuscular mycorrhizal associations reduce the performance of foliar chewing insects like *S. frugiperda*. This effect was suggested to be linked to AMF induced host plant defense responses increasing the amounts of bioactive metabolites toxic to such herbivores, although depending on AMF species (Koricheva et al. 2009). The observed improved herbivore performance in the present study with a maize mycorrhiza association suggests that interactions between foliar chewing insects and AMF are complex, depending on plant and AMF species and most likely also growth substrate nutritional status, which needs to be further examined. In general, information on maize–mycorrhiza–herbivores is limited (Zitlalpopoca-Hernandez et al. 2017; Murrell et al. 2019)

Our results suggest that AMF-mediated increased maize shoot P status is most likely responsible for the increased food quality for *S. frugiperda*. Similarly, Goverde et al. (2000) found that AMF increased shoot P concentration of *Lotus coniculatus* coincided with improved life history traits of the lepidopteran herbivore, *Polyommatus icarus*. On the other hand, Bernaola et al. (2018) reported that improved performance of *S. frugiperda* and other pests in rice was not related to alterations in shoot nutrient composition, but rather alterations in defense-related pathways. This may also be the case in our study, but as in the case of Bernaola et al. (2018), plant defense was not measured in the present study. Future studies on plant–AMF–herbivore interactions should include more detailed analyses of both plant nutrition and defense, to unravel underlying mechanisms of the observed interactions.

It is well known that N fertilization improving shoot N concentration can increase performance of insect herbivores (Mattson 1980), whereas information on the effects of P

fertilization on insect herbivores is less studied (Huberty and Denno 2006). However, in vitro studies where P was added to the diet have been shown to increase the growth of lepidopteran larvae (Clancy and King 1993). Also, improved growth of *Manduca sexta* larvae was observed when feeding on leaves of P-fertilized *Datura wrightii* (Perkins et al. 2004). Similarly, Janssen (1994) reported increased larval growth of *Spodoptera exempta* with increased P concentration in maize leaves.

Interestingly, recovery of larvae feeding on shoots from plants fertilized with P without mycorrhiza was very low and the few recovered ones had lower average biomass compared to that of larvae feeding on shoots of mycorrhizal plants or non-mycorrhizal plants without P fertilization. Overall, the shoot N concentration was low, and from visual observations, symptoms of maize N deficiency were apparent with chlorotic leaves. The observed reduction in larval performance may be due to induced resistance from N deficiency, which is common for a wide range of herbivores (Tingey and Singh 1980). Plant deficiency from nutrients such as N, P, and K has been shown to induce alterations in the production of secondary metabolites such as the increase in phenolic compounds used in plant defense (Gershenzon 1984; Chishaki and Horiguchi 1997; Fortier et al. 2006), which may explain the low recovery of larvae observed in the present study. Similarly, Slansky (1993) reported that lepidopteran larvae avoid feeding on nutrient deficient foliage, which may even have repellent effects against herbivores. Moreover, Estiarte et al. (1994) found that larvae of *Helicoverpa armigera* feeding on N-deficient plants had lower biomass than those feeding on plants with normal N concentration. Future studies on *S. frugiperda* herbivory as affected by AMF and/or P fertilization should employ confined herbivory compartments where larvae can be fully accounted.

Overall, the observed herbivory did not result in plant growth reduction, which indicates some degree of tolerance allowing the plant to recover from herbivore infestation (Núñez-Farfán et al. 2007; Peterson et al. 2017; Wang et al. 2018). Although mycorrhizal plants suffered from higher levels of herbivory than non-mycorrhizal plants regardless of P fertilization, no effect on plant growth was observed, suggesting a higher tolerance level in mycorrhizal plants. This concurs with other studies on mycorrhiza mediated tolerance to pest infestation, which seems to be related to improved nutrient acquisition and/or increased photosynthetic activity (Vannette and Hunter 2009).

Herbivory slightly reduced and increased the percentage of AMF root colonization in H-318 and PUMA, respectively, while herbivory had no effect on root dry weight. The observed changes in AMF root colonization seems to be associated with altered resource allocation to the mycorrhizal association depending on maize genotype. This coincides with Gehring and Bennett (2009), who reported varying effects of

foliar herbivory on AMF, although the consensus is that foliar herbivory diminishes AMF performance due to reduction of photosynthetic area, resulting in lower allocation of carbohydrates to the roots and thereby reduced resources for biotrophic fungal symbiont growth (Gange et al. 2002; Gehring and Bennett 2009). However, in general, effects of foliar herbivory on the performance of mycorrhizal associations have been shown to be limited as was the case in the present study (Barto and Rillig 2010).

Ryan and Graham (2018) recently questioned the relevance of managing AMF in agroecosystems while calling for additional field-based evidence of the claimed crop benefits of AMF. Likewise, field-based studies on the effects of AMF on plant–arthropod interactions are limited (Heinen et al. 2018). The observed improved performance of *S. frugiperda* larvae feeding on leaves of mycorrhizal maize may result in reduced crop health and hence yield reduction, but studies on effects of AMF on natural enemies of *S. frugiperda* in the field would provide a more balanced idea of effects of AMF on crop health. Plants with AMF may also promote the performance of natural enemies of *S. frugiperda*, as has been shown with predator spiders regulating spider mite infestation in mycorrhizal bean (Hoffmann et al. 2011).

In conclusion, our results show that field communities of AMF promoting maize growth and nutrition, may also increase the insect damage by improving the food quality of maize leaves for larval growth, which seems to be linked to increased P uptake by the maize mycorrhizal association. Such plant biotic interactions seem to be important to consider when developing pest management strategies in maize agroecosystems. However, this needs to be investigated under field conditions in future experiments.

Acknowledgments We thank the Biological Sciences Postgraduate program of the National Autonomous University of Mexico for facilitating PhD training for Raúl Omar Real Santillan. 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.

References

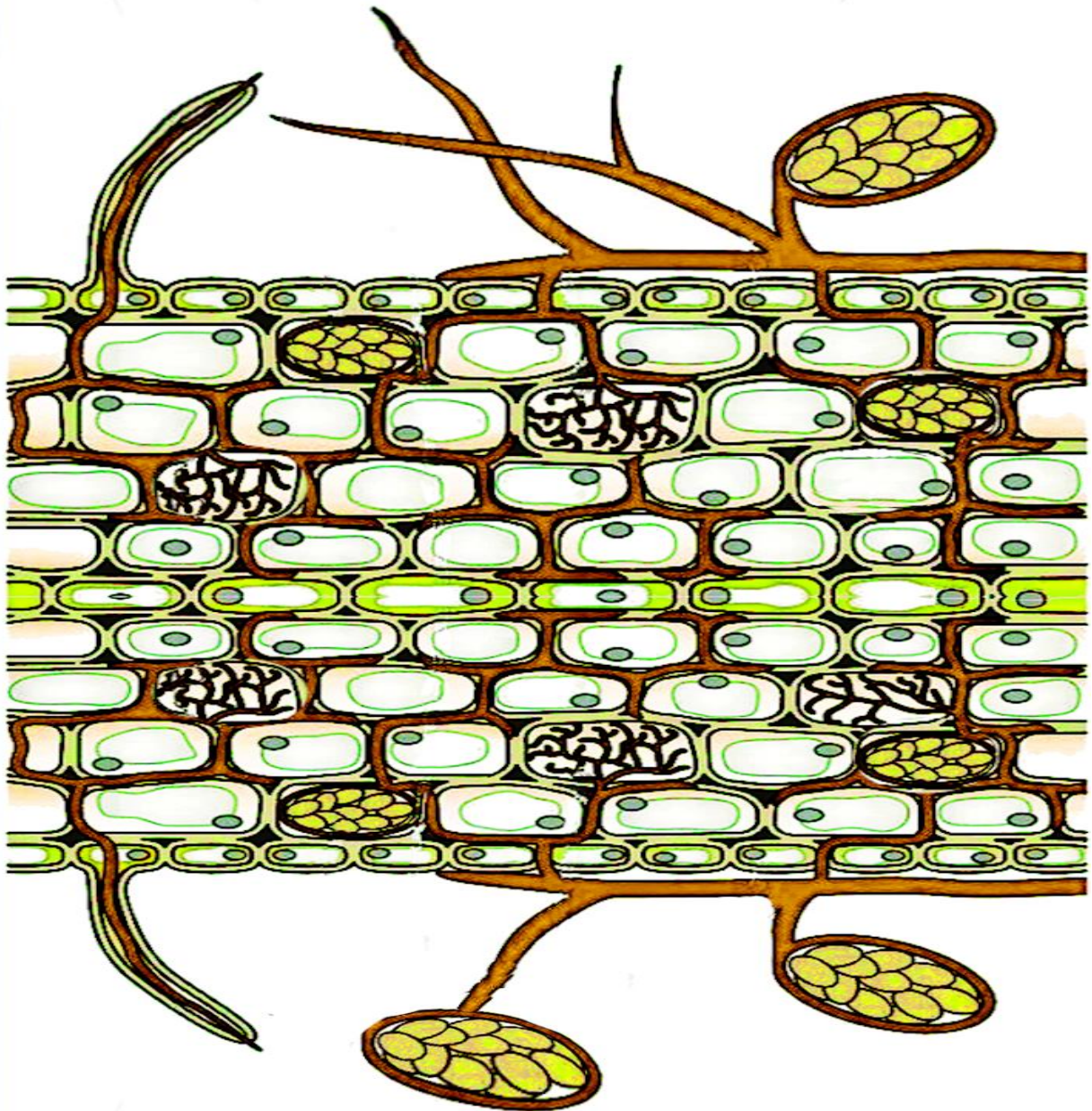
- Altieri M, Nicholls C (2004) Biodiversity and pest management in agroecosystems. CRC Press, Boca Raton
- Alvarado-Herrejón M, Larsen J, Gavito ME, Jaramillo-López PF, Vestberg M, Martínez-Trujillo M, Carreón-Abud Y (2019) Relation between arbuscular mycorrhizal fungi, root-lesion nematodes and soil characteristics in maize agroecosystems. *Appl Soil Ecol* 135:1–8
- Barto EK, Rillig MC (2010) Does herbivory really suppress mycorrhiza? A meta-analysis. *J Ecol* 98:745–753
- Bennetzen JL, Hake SC (eds) (2009) Handbook of maize: genetics and genomics. Springer Science & Business Media, Berlin
- Bemaola L, Cosme M, Schneider RW, Stout M (2018) Belowground inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi increases local and systemic susceptibility of rice plants to different pest organisms. *Front Plant Sci* 9:747
- Bremner JM (1996) Nitrogen-total. In: Sparks DL (ed) Methods of soil analysis, part 3. Soil Science Society of America, Madison, pp 1085–1121
- Chishaki N, Horiguchi T (1997) Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. *Soil Sci Plant Nutr* 43:987–991
- Clancy KM, King R (1993) Defining the western spruce budworm's nutritional niche with response surface methodology. *Ecology* 74: 442–454
- 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. *Field Crop Res* 209:1–9
- Domínguez CA, Dirzo R (1995) Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evol Ecol* 9:204–216
- Estiarte M, Filella I, Serra J, Penuelas J (1994) Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Oecol* 99: 387–391
- Fortier E, Desjardins Y, Tremblay N, Bélec C, Côté M (2006) Influence of irrigation and nitrogen fertilization on broccoli polyphenolics concentration. In: International Symposium on Vegetable Safety and Human Health 856, pp 55–62
- Gange AC (2007) Insect mycorrhizal interactions: patterns, processes and consequences. In: Ohgushi T et al (eds) Ecological communities: plant mediation in indirect interaction webs. Cambridge University Press, Cambridge, pp 124–143
- Gange AC, Bower E, Brown VK (2002) Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonization. *Oecol* 131:103–112
- García-Rodríguez Y, Bravo-Monzón A, Martínez-Díaz Y, Torres-Gurrola G, Espinosa-García FJ (2012) Variación Fitoquímica Defensiva en Ecosistemas Terrestres. In: Rojas JC, Malo EA (eds) Temas Selectos en Ecología Química de Insectos. El Colegio de la Frontera sur, Lerma Campeche, pp 217–252 446 p
- Garrido E, Bennett AE, Fornoni J, Strauss SY (2010) Variation in arbuscular mycorrhizal fungi colonization modifies the expression of tolerance to above-ground defoliation. *J Ecol* 98:43–49
- Gavito ME, Miller MH (1998) Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant Soil* 198:185–192
- Gehring C, Bennett A (2009) Mycorrhizal fungal–plant–insect interactions: the importance of a community approach. *Environ Entomol* 38:93–102
- Gershenzon J (1984) Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In: Phytochemical adaptations to stress. Springer, Boston, pp 273–320
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519–530
- Giovannetti M, Mosse (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489–500
- Goverde M, van der Heijden M, Wiemken A, Sanders I, Erhardt A (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi influence life history traits of a lepidopteran herbivore. *Oecol* 125:362–369
- Heinen R, Biere A, Harvey JA, Bezemer M (2018) Effects of soil organisms on aboveground plant–insect interactions in the field: patterns, mechanisms and the role of methodology. *Front Ecol Evol* 6:106
- Hoffmann D, Vierheilig H, Pender S, Schausberger P (2011) Mycorrhiza modulates aboveground tri-trophic interactions to the fitness benefit of its host plant. *Ecol Entomol* 36:574–581

- Huberty AF, Denno RF (2006) Consequences of nitrogen and phosphorus limitation for the performance of two planthoppers with divergent life-history strategies. *Oecol* 149:444–455
- Janssen JAM (1994) Impact of the mineral composition and water content of excised maize leaf sections on fitness of the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull Entomol Res* 84:233–245
- Koricheva J, Gange AC, Jones T (2009) Effects of mycorrhizal fungi on insect herbivores: a meta-analysis. *Ecol* 90:2088–2097
- Kormanik PP, McGraw AC (1982) Quantification of vesicular arbuscular mycorrhiza in plant roots. In: Schenck NC (ed) *Methods and principles of mycorrhizal research*. American Phytopathological Society, St Paul, pp 37–45
- Kumar A, Verma JK (2018) Does plant–microbe interaction confer stress tolerance in plants?: a review. *Microbiol Res* 207:41–52
- López-Carmona DA (2013) Respuesta de micorrizas de maíz (*Zea mays*) a un gradiente de estrés hídrico y fertilización mineral. MSc thesis. Universidad Nacional Autónoma de México. 77 p
- López-Carmona DA, Alarcón A, Martínez-Romero E, Peña-Cabriaes JJ, Larsen J (2019) Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios. *Rhizosphere* 9:38–46
- Machado RA, Ferrieri AP, Robert CA, Glauser G, Kallenbach M, Baldwin IT, Erb M (2013) Leaf-herbivore attack reduces carbon reserves and regrowth from the roots via jasmonate and auxin signaling. *New Phytol* 200:1234–1246
- Mattson WJ Jr (1980) Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Ann Rev Ecol Syst* 11:119–161
- Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors V (2017) Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annu Rev Plant Biol* 68:485–512
- Médiène S, Valantin-Morison M, Sarthou JP, De Tourdonnet S, Gosme M, Bertrand M, Pelosi C (2011) Agroecosystem management and biotic interactions: a review. *Agron Sustain Dev* 31:491–514
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27: 31–36
- Murrell EG, Ray S, Lemmon ME, Luthe DS, Kaye JP (2019) Cover crop species affect mycorrhizae-mediated nutrient uptake and pest resistance in maize. *Renew Agr food Syst*:1–8
- Núñez-Farfán J, Fomoni J, Valverde PL (2007) The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 38:541–566
- Pedigo LP, Rice M (2009) *Entomology and pest management*. Pearson, London
- Perkins MC, Woods HA, Harrison JF, Elser JJ (2004) Dietary phosphorus affects the growth of larval *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* 55:153–168
- Peterson RKD, Varella AC, Higley LG (2017) Tolerance: the forgotten child of plant resistance. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.3934>
- Poitout S, Bues R (1974) Elevage de chenilles de vingt-huit espèces de Lépidoptères Noctuidae et de deux espèces d'Arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de l'élevage selon les espèces In *Annales de zoologie: Ecologie animale*
- Pozo MJ, Azcón AC (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* 10:393–398
- Ramírez Gómez M, Rodríguez A (2012) Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión. *Rev Colomb Biotecnol* 14:271–284
- Ryan MH, Graham JH (2018) Little evidence that farmers should consider abundance or diversity of arbuscular mycorrhizal fungi when managing crops. *New Phytol* 220:1092–1107
- 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
- Sarabia M, Jakobsen I, Grønlund M, Carreón-Abud Y, Larsen J (2018) Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. *Appl Soil Ecol* 125:18–25
- Sawers RJ, Svane SF, Quan C, Grønlund M, Wozniak B, Gebreselassie MN, Jakobsen I (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
- Slansky F Jr (1993) Nutritional ecology: the fundamental quest for nutrients. In: Stamp NE, Casey TM (eds) *Caterpillars, ecological and evolutionary constraints on foraging*. Chapman & Hall, New York, pp 29–91
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Academic, Cambridge
- St-Arnaud M, Vujanovic V (2007) Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. *Mycorrhizae in crop production*. Haworth, New York, pp 67–122
- Tang X, Ma Y, Hao X, Li X, Li J, Huang S, Yang X (2009) Determining critical values of soil Olsen-P for maize and winter wheat from long-term experiments in China. *Plant Soil* 323:143–151
- Tingey WM, Singh SR (1980) Environmental factors influencing the magnitude and expression of resistance. In: Maxwell FG, Jennings PR (eds) *Breeding plants resistant to insects*. Wiley, New York, pp 89–113
- Vannette RL, Hunter MD (2009) Mycorrhizal fungi as mediators of defense against insect pests in agricultural systems. *Agric For Entomol* 11:351–358
- Veresoglou SD, Rillig MC (2012) Suppression of fungal nematode plant pathogens through arbuscular mycorrhizal fungi. *Biol Lett* 8:214–217
- Wang S, Ding T, Xu M, Zhang B (2018) Bidirectional interactions between beet armyworm and its host in response to different fertilization conditions. *PLoS One* 13:e0190502
- Whipps JM (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can J Bot* 82:1198–1227
- Zitlalpopoca-Hernandez G, Najera-Rincon MB, del-Val E, Alarcón 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

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

CAPÍTULO III

LAS ASOCIACIONES MICORRÍZICAS MODULAN LAS INTERACCIONES ENTRE INSECTOS HERBÍVOROS ARRIBA Y ABAJO DEL SUELO EN PLANTAS DE MAÍZ Y EN CONDICIONES DE INVERNADERO



Anatomía de la raíz micorrizada. Modificada de Mauser, J. D. (1988). Plant anatomy pp 560.

LAS ASOCIACIONES MICORRÍZICAS MODULAN LAS INTERACCIONES ENTRE INSECTOS HERBÍVOROS ARRIBA Y ABAJO DEL SUELO EN PLANTAS DE MAÍZ

Resumen

En un cultivo como es el maíz, las plantas se asocian mediante su sistema radicular con los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), en una asociación generalmente positiva. Sin embargo, las plantas también son afectadas negativamente por diversos insectos herbívoros que se alimentan de sus tejidos y provocan pérdidas a los productores. Aunque estas interacciones entre plantas, HMA e insectos herbívoros son comunes hay muy pocos trabajos en la literatura, donde se trabaje con insectos arriba y abajo del suelo en un mismo sistema. Para contribuir en el conocimiento sobre estas interacciones multitróficas, realizamos un experimento multifactorial en un invernadero con plantas de maíz, HMA nativos provenientes de un suelo agrícola y dos especies de insectos herbívoros: el gusano cogollero y la gallina ciega. Los resultados principales muestran que los dos insectos tienen un mejor desarrollo en plantas micorrizadas y que los insectos arriba del suelo tienen la capacidad de afectar negativamente a los que se encuentran abajo. Además, se muestra que *P. vetula* puede afectar la toma de nutrientes como el fósforo y reducir la colonización micorrízica al alimentarse de las raíces. Se concluye que las asociaciones micorrízicas pueden hacer a las plantas tolerantes y ayudarles a soportar la herbivoría de los insectos y que estas asociaciones pueden afectar la competencia interespecífica entre los insectos al volverla asimétrica cuando hay limitación de nutrientes. Sin embargo, son necesarios más trabajos donde se pongan a prueba estas interacciones, de preferencia en condiciones de campo.

Introducción

En un cultivo como el maíz *Zea mays* L. (Poaceae) hay una gran variedad de seres vivos que coexisten e interactúan, sin embargo, la mayoría de estas interacciones pasan desapercibidas. Por otra parte, cada vez más se reconoce que en los agroecosistemas coexisten una pléyade de organismos que forman redes tróficas complejas y que es necesario estudiarlos de una forma holística e integrada (Bahena y Velázquez, 2012).

Una de las interacciones más antiguas, es la que forman las plantas con los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), la cual se estima tiene aproximadamente 400 millones de años y es generalmente mutualista (Smith y Read, 2008). Los HMA expanden el área de búsqueda de agua y nutrientes como: el Fósforo (P), Nitrógeno (N), Zinc (Zn) y los transportan a las raíces, a cambio reciben de la planta carbohidratos de la fotosíntesis (Smith y Read, 2008). Los HMA

también mejoran la nutrición de las plantas, así como la resistencia y tolerancia al estrés biótico y abiótico, además mejoran la estructura y fertilidad del suelo (Chen et al. 2018) y pueden ser clave para una agricultura sustentable (Martín-Robles et al. 2018).

Otra interacción también antigua y presente en todos los ecosistemas, es la que forman las plantas y los insectos que se alimentan de sus tejidos, que generalmente es negativa. Entre los diversos insectos herbívoros del maíz, destaca, el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), el cual representa la principal plaga de este cultivo en América (Nagoshi et al. 2018).

S. frugiperda es una especie polífaga y voraz, que produce grandes pérdidas en el rendimiento del maíz (Nagoshi, et al 2018). Esta especie se alimenta también de otros cultivos de importancia económica como el Arroz, Soya Trigo, Frijol, Jitomate, Sorgo, entre otros (Nagoshi et al. 2018).

Otro insecto, económicamente importante que consume la parte radicular de las plantas de varios cultivos, es el complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae), que incluye escarabajos de diversos géneros (Morón, 2010). Entre estos insectos se encuentra: *Phyllophaga vetula* Horn (Coleoptera: Scarabeidae: Melolonthinae), el cual se alimenta de las raíces de varios cultivos como el maíz en su etapa larval y ocasiona daños importantes a los productores (Morón, 2010).

Los efectos de las interacciones entre insectos y los HMA pueden ser difíciles de pronosticar. Por ejemplo, los HMA pueden influir en la nutrición y desarrollo de la planta, en la respuesta de defensa de la planta, e incluso en la competencia entre insectos (McClure, 1983; Masters et al. 1993; Barber et al. 2013). De la misma manera, los insectos herbívoros pueden tener efectos variados sobre los HMA (Gehring y Bennett, 2009), como el de reducir la tasa de colonización (Gehring y Whitham, 1991). Sin embargo, existe el consenso, de que los HMA pueden inducir la resistencia de las plantas, e incidir negativamente sobre los insectos masticadores (Pozo y Azcón, 2007). A pesar de lo anterior, los trabajos donde se estudian estas interacciones son escasos (Meier y Hunter, 2018), y aún falta mucha información, particularmente sobre cómo las asociaciones micorrízicas median las respuestas de las plantas hacia los herbívoros y viceversa. Por tanto, para mejorar la comprensión sobre este tema, se realizó un experimento multifactorial en invernadero con plantas de maíz, *S. frugiperda*, *P. vetula* y un consorcio de HMA nativos de un suelo agrícola. Nuestra hipótesis fue: que las asociaciones micorrízicas mediante la activación de la resistencia inducida, ayudaran a las plantas a resistir el ataque de los insectos herbívoros y modulan sus interacciones.

Materiales y métodos

Diseño experimental

El experimento consiste en un diseño multifactorial con tres factores: 1) HMA (con y sin), 2), *S. frugiperda* (con y sin) y 3) *P. vetula* (con y sin), dando un total de ocho tratamientos y seis repeticiones (2x4x6). El experimento se llevó a cabo en un invernadero.

Materiales biológicos

El maíz utilizado fue el híbrido PUMA de Asgrow[®]. Esta variedad es precoz y con una buena sanidad (Martínez et al. 1999). Las semillas fueron desinfectadas y después germinadas por 96 h, tras lo cual se trasplantaron. *S. frugiperda* provino de una cría establecida en el IIES- UNAM Campus Morelia Michoacán. *P. vetula* fue colectada en la localidad de Cantabria municipio de Zacapu Michoacán, en un sembradío de maíz (19° 49' 57" N y 101° 43' 21" W) y fueron colocadas individualmente en recipientes plásticos con Peat Moss y alimentadas con rodajas de zanahoria manteniéndose en cuarentena por dos semanas. Los HMA y el suelo utilizado provinieron de un suelo agrícola del Centro Regional Universitario Centro Occidente de la Chapingo en Morelia, Michoacán (19° 41' 09" N y 101° 14' 17" W).

Suelo

El suelo era tipo Luvisol arcilloso (INEGI 2019), tenía un pH neutro (7.28), con 5.8, 23.2 y 303 ppm de fósforo, nitrógeno y potasio respectivamente. Además, contenía 53.2, 19.4 y 27.2% de arcilla, arena y limo respectivamente. El suelo fue mezclado con arena de río silicada, en proporción 1:1 (peso/peso). En seguida, la mezcla fue esterilizada en un esterilizador eléctrico ProGrow[®] a 93 °C por 72 h. Los tratamientos con micorrizas consistieron en el mismo suelo sin esterilizar.

Posteriormente, todo el suelo fue fertilizado con una solución mineral completa, que consistió en las siguientes proporciones (mg kg⁻¹ de sustrato): KH₂PO₄ (30), K₂SO₄ (30), CaCl₂·2H₂O (30), CuSO₄·5H₂O (2.1), ZnSO₄·7H₂O (5.4), MnSO₄·H₂O (10.5), CoSO₄·7H₂O (0.39), MgSO₄·7H₂O (45), Na₂MoO₄·2H₂O (0.18) NH₃NO₄ (30). El NH₄NO₃ se aplicó hasta la segunda semana, y semanalmente hasta el fin del experimento.

Establecimiento del experimento

A las macetas que contenían 1.2 kg del suelo se les trasplantaron las plántulas germinadas. Posteriormente, todas las macetas se regaron con 80% de la capacidad de campo.

Posteriormente, se inocularon microorganismos del suelo (excepto HMA) a todas las plantas, con el fin de evitar el efecto que estos pudieran tener en los resultados. Para ello, se realizó un filtrado

consecutivo de la siguiente forma: primero, se trituraron 200 g del suelo sin esterilizar y se disolvieron en 1.5 L de agua, revolviéndose en un agitador Corning® PC-420D con varillas magnéticas por 1 h a 750 RPM. A continuación, la solución se filtró en varios tamices, cada uno con un diámetro de poro más pequeño que el anterior (1.68 mm, 1 mm, 0.425 mm, 0.2 mm, 0.035 mm), y por último la solución se dejó filtrar por 12 h en papel filtro. Finalmente, el líquido resultante se mezcló en 6 L de agua y se inocularon 100 ml a todas las plantas.

A las cinco semanas se procedió a colocar los insectos. Primero, todas las plantas fueron cubiertas con una tela de tergal francés de 0.2 mm de diámetro de poro para contener a las larvas. A las plantas que tenían el tratamiento con *S. frugiperda*, les fueron colocadas siete larvas en el segundo estadio (L₂) en hojas adyacentes al cogollo. A las plantas que debían llevar *P. vetula*, se les colocaron cuatro larvas en L₂. Se dejó que los insectos se alimentaran de las plantas por dos semanas.

Cosecha

A las siete semanas, las larvas fueron retiradas de las plantas y pesadas en una balanza analítica de la marca Ohaus®. Posteriormente, se evaluó visualmente la herbivoría en la parte foliar con seis categorías de daño: 1, 2, 3, 4, 5, 6 (0-1, 1-5, 6-12, 13-25, 26-50, 51-100% de área dañada, respectivamente) (Dirzo y Domínguez, 1995). A continuación, se separó la parte aérea de las raíces de las plantas y se eliminaron restos de suelo. La parte aérea fue secada en un horno Fisher Scientific® a 80 °C durante 72 h y posteriormente pesadas. Las raíces, se almacenaron a -20 °C para su posterior procesamiento.

Colonización micorrízica

Las raíces previamente almacenadas fueron homogeneizadas y cortadas transversalmente en 1 cm de longitud. Se recuperaron 2 g de tejido y se colocaron en contenedores plásticos almacenándose a -20 °C. Inmediatamente después, las raíces se pesaron en fresco y se secaron en el horno antes mencionado, a una temperatura de 80 °C por 72 h para posteriormente registrar su peso.

Un mes después, se procedió a teñir las raíces con el método modificado de Phillips y Hayman (1970). Posteriormente, las raíces teñidas fueron observadas en un estereoscopio de la marca Amscope®, con el método del intercepto (Giovannetti y Mose, 1980) para cuantificar la presencia de estructuras micorrízicas.

Nitrógeno y fósforo de la parte aérea y radical

Las muestras secas de la parte aérea y de la raíz se pulverizaron en un molino Thomas Scientific® con una malla de 0.424 mm. Posteriormente, se pesaron ≈ 0.25 g de cada muestra, tanto de la parte

aérea como radical de las plantas, con el fin de cuantificar por medio de una biodigestión la concentración de N y P (mg kg^{-1}) con el método Micro-Kjeldahl (Murphy y Riley, 1962; Bremner, 1996).

Análisis estadístico

Las variables fueron analizadas con ANOVAs de tres vías. Los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianza se verificaron con las pruebas Anderson-Darling y Bartlett, respectivamente. Cuando estos supuestos no se cumplieron, se procedió a transformar los datos con logaritmo natural o con raíz cuadrada. El porcentaje de colonización micorrízica se transformó angularmente. Para encontrar diferencias entre medias, se usó la prueba post-hoc LSD (least significant differences). Los análisis se realizaron en el programa Statgraphic Centurion XV (Statpoint[®]) y, las gráficas en Prism 7.0 (Graphpad[®]).

Resultados

Se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los tratamientos que contenían plantas micorrizadas y con la gallina ciega (tabla 1). No obstante, el gusano cogollero solo afectó las variables del peso seco aéreo y la respuesta del crecimiento por los HMA (tabla 1). *P. vetula* interactuó con los HMA disminuyendo la toma de P. También los insectos en combinación interactuaron con los HMA y, se observó una competencia interespecífica (tabla 1).

Biomasa aérea y radical de la planta de maíz

El peso seco aéreo presentó diferencias significativas en los tres efectos simples, tanto de los HMA, *S. frugiperda* y de *P. vetula*. Las raíces solo fueron afectadas por la gallina ciega.

En la parte aérea, se encontró una depresión de crecimiento debido a que las plantas control presentaron una mayor biomasa aérea que las plantas micorrizadas, las cuales disminuyeron 26.3% en peso en comparación a las primeras (Fig. 1A). Los dos insectos, tanto *S. frugiperda* como *P. vetula* disminuyeron el peso de las plantas (19.1 y 11% respectivamente) comparadas con las plantas sin herbívoros (Fig. 1C y 1E),

La biomasa de las raíces no fue afectada, ni por los HMA ni por *S. frugiperda* (Fig. 1B y 1D). Sin embargo, cuando la gallina ciega estaba presente, se observó una disminución de 27.6% del peso radical.

Crecimiento de la planta en respuesta a los HMA

En la variable del índice de respuesta en el crecimiento de la planta a los HMA. Las plantas de las cuales se alimentaron las larvas del gusano cogollero y de la gallina ciega, presentaron un menor

efecto debido a las asociaciones micorrízicas, con respecto a las plantas sin insectos, luego de dos semanas de herbivoría (Fig. 2A y 2B).

Desempeño de los insectos herbívoros

La herbivoría por *S. frugiperda* aumento 19.3% el daño en plantas micorrizadas (Fig. 3A), y esto también se ve reflejado en un mayor peso de las larvas (46.1%) comparadas con aquellas que se alimentaron de plantas sin micorrizar (Fig. 3B).

Uno de los resultados más interesantes de este trabajo, es la interacción que se observó en el peso de *P. vetula* en el tratamiento que combina la presencia de los dos insectos y el efecto de los HMA, es decir, cuando las larvas compitieron por los recursos del mismo hospedero, debido a que en el tratamiento que contenía la combinación de los dos insectos (*S. frugiperda* + *P. vetula*) y que se alimentaban de las plantas con HMA, se observó que *P. vetula* presento un mayor desarrollo (23.7%) al alimentarse de plantas sin micorrizar, que presentaron mas desarrollo en plantas micorrizadas Fig. 3C).

Colonización micorrízica

En los tratamientos sin micorrizar no se observó contaminación por HMA. *S. frugiperda* no afecto la colonización (Fig. 4A). Sin embargo, las raíces de plantas con *P. vetula* mostraron una menor colonización, disminuyendo 12.6% la presencia de HMA (Fig. 4B).

Nitrógeno y fósforo de la parte aérea y radical

Nitrógeno

En la parte aérea, las plantas micorrizadas presentaron una menor concentración de nitrógeno (21.7%) respecto a las plantas sin micorrizar (Tabla 2). Por otra parte, las plantas con daño de larvas de gallina ciega, también presentaron una disminución de este elemento (14.1 %) (Tabla 2) en comparación con las plantas control (sin daño).

Las plantas micorrizadas presentaron una menor concentración de nitrógeno en las raíces (21.7%) respecto a las plantas no micorrizadas (Tabla 2).

Fósforo

En la parte aérea, la interacción entre los factores de HMA x *P. vetula* muestra que las plantas micorrizadas sin daño por gallina ciega presentaron mayor concentración de fósforo (73.8%) que cuando estaba presente este insecto edáfico (32.6%) (Tabla 2).

La concentración de fósforo en las raíces mostro una interacción significativa, en la cual se observa que las plantas micorrizadas sin daño por *P. vetula*, aumentaron 78.7% la concentración de P

respecto a las plantas que tenían la plaga, para las cuales el aumento de la concentración de P fue 24.4%, comparadas con control (Tabla 2).

Relación nitrógeno/fósforo

La relación nitrógeno/fósforo en la parte aérea muestra que cuando las plantas son micorrizadas, hay una menor proporción de la concentración nitrógeno/fósforo, aproximadamente 47.7% comparadas con las plantas no micorrizadas (Tabla 2). De igual forma, en la parte radicular, cuando las raíces eran colonizadas por los HMA, disminuían 46.5% con respecto a las plantas no micorrizadas (Tabla 2) y, por el contrario, cuando se encontraba la gallina presente, aumento la proporción de estos elementos en un 25.5% (Tabla 2).

Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar en un mismo sistema, dos de las interacciones más antiguas y recurrentes en la naturaleza: la de los insectos herbívoros que consumen tejido de las plantas, y la de los HMA que son simbioses de estas. Los resultados principales muestran que los insectos se benefician de la asociación micorrízica debido a un incremento de la calidad nutricional de la planta, y que las asociaciones micorrízicas posiblemente modulen la competencia inter específica entre insectos que comparten el mismo hospedero.

Biomasa de la planta

En general, cuando las plantas estaban micorrizadas presentaron un menor desarrollo. Es probable, que haya existido una depresión que causo una disminución en el crecimiento, debido a que al inicio de la colonización las plantas invierten recursos en establecer la simbiosis (Graham, 2000). Esta disminución del crecimiento puede ser causada por altas demandas de los HMA por el C orgánico, que llegan a superar los beneficios del mutualismo que se produce por la transferencia de nutrientes (Peng et al. 1993; Li et al. 2008). Además, las asociaciones micorrízicas pueden ser un continuo, que va del mutualismo al parasitismo (Klironomos, 2003), donde al inicio de la interacción, los HMA pueden ser parásitos o mutualistas débiles (Johnson et al. 1997). En concordancia con este trabajo García-Gómez (2019) y Schroeder y Janos (2004) observaron una depresión de crecimiento de plantas de maíz micorrizadas en la fase vegetativa.

También se ha encontrado depresiones en el crecimiento de plántulas y arboles de cítricos que se han explicado por los costos de construcción y mantenimiento de la simbiosis (Peng et al. 1993; Graham y Eissenstat, 1998). Sin embargo, es probable que esta sea transitorias y pueda ser superada en etapas posteriores (Schroeder y Janos, 2004), ya que estos “sumideros” de C puedan estimular la fotosíntesis (Kaschuk et al. 2009; Gavito et al. 2019). Por lo tanto, las depresiones de

crecimiento debidas a sumideros de C, no debería ser un problema, puesto que además de ser temporales, son más importantes los servicios ecosistémicos brindados por los HMA, por ejemplo al mejorar la salud y la calidad nutricional de las plantas (Gianinazzi et al. 2010).

Nutrición de la planta

En este trabajo, el P en el suelo estaba en un nivel por debajo del umbral mínimo para la siembra de maíz, que es $<15 \text{ mg P kg}^{-1}$ (Tang et al. 2009). Se conoce que las asociaciones micorrízicas son sensibles al P (Smith y Read, 2008) y para no inhibir la colonización, se añadió una pequeña cantidad de P ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$).

Dependiendo de la presencia o ausencia de la colonización micorrízica, las concentraciones de P y N fluctuaron. Generalmente, el P se presentó una mayor concentración en plantas micorrizadas, sin embargo, esta mayor cantidad de P, no tuvo efectos en el crecimiento de estas. A este respecto, se conoce que la contribución del P en plantas micorrizadas, no siempre se correlaciona positivamente con el crecimiento (Smith et al. 2003; Li et al. 2008). Aunque no haya respuestas positivas en el crecimiento debido a los HMA, se pueden encontrar grandes concentraciones de P en el tejido de las plantas micorrizadas, lo cual coincide con lo reportado por Li et al. (2008), que no observaron efectos positivos de los HMA, en el crecimiento y desarrollo de plantas de trigo, pero si cuantificaron 50% más contenido de P.

Por otra parte, la herbivoría en las raíces por *P. vetula* redujo el flujo de P a la planta. Además, no solo el P es limitante, también la limitación por N puede tener consecuencias negativas en el crecimiento de las plantas (Crawford y Glass, 1998). En este trabajo, se encontraron menores concentraciones de N en plantas crecidas con HMA. Se ha reportado que en plantas como las coníferas, las cantidades de N en plantas colonizadas dependen de la limitación de nutrientes. Por ejemplo, Hobbie y Colpaert (2003) reportaron una menor cantidad de ^{15}N en plantas de *Pinus sylvestris* (Pinaceae) crecidas en suelos limitados con N y con la asociación micorrízica, concluyendo que los hongos micorrízicos retuvieron gran parte del ^{15}N en sus tejidos. En concordancia con este trabajo, Hobbie y Colpaert (2003) también encontraron una mayor asignación de N en las plantas de pinos no colonizadas por hongos ectomicorrízicos.

No obstante, en este trabajo el nutriente limitante fue el P, que se encontraba en bajas cantidades y el N no fue limitado de modo alguno, sino que se aplicó constantemente 30 mg kg^{-1} semanalmente. En este sentido, Azcón et al. (2003), encontraron en plantas de lechuga *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) con limitación de P, una menor cantidad de N en plantas micorrizadas, aunque la concentración en el suelo fuera alta.

Por otra parte, las plantas pueden llegar a competir por recursos con varios taxa de HMA, e incluso con la comunidad microbiana asociada a la materia orgánica y a la mineralización del N (Maherali y Klironomos, 2007). En este sentido, se conoce que la respuesta del P y el N en las plantas micorrizadas y no micorrizadas puede ser diferencial (Johnson et al. 2013). Por tanto, en este trabajo la nutrición de la planta depende no solo de la cantidad de (N y P), sino también de los HMA y los insectos rizófagos.

Efecto de los HMA sobre los insectos y viceversa

Las asociaciones micorrízicas tuvieron un efecto positivo en el desarrollo de los insectos, y estos, mediante la herbivoría disminuyeron la biomasa del maíz. Cuando los dos insectos se alimentaban de las plantas micorrizadas se apreció un mayor desarrollo de *S. frugiperda* y *P. vetula*. En dos experimentos en invernadero, Aguilar et al. (2019) y García-Gómez, (2019) encontraron que las larvas de *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) y de *S. frugiperda* presentaban un mayor peso larvario cuando se alimentaban de plantas de maíz micorrizadas.

Por otra parte, las plantas no micorrizadas tienen una baja calidad nutricional que las hace menos apetecibles, y que incluso presenten efectos deterrentes (Bennett et al. 2005). Por tanto, en este estudio, la asociación micorrízica beneficio a los insectos, al hacer la planta más palatable.

Colonización micorrízica

Las raíces micorrizadas presentaron una menor colonización cuando estaba presente *P. vetula*. Se ha señalado que la herbivoría de los insectos rizófagos puede disminuir la colonización micorrízica (Brown y Gange, 1990). Sin embargo, esto dependerá de la especie de planta, del tipo de insecto y de los HMA estudiados (Kurtz y Vidal, 2010). En concordancia con este trabajo, Zitlalpopoca-Hernandez et al. (2017) estudiaron la interacción entre los HMA, el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, plantas de maíz y larvas de *P. vetula*, encontrando una menor colonización en plantas con las larvas, ellos lo atribuyen a que estas raíces pueden ser palatables al tener una mejor calidad nutricional.

En otro estudio, Bennett et al. (2013) encontraron una menor colonización en plantas de *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae), cuando eran atacadas por el insecto *Otiorhynchus sulcatus* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae), mientras que en un reciente estudio con arroz *Oryza sativa* L. (Poaceae), Bernaola et al. (2018) observaron una mejora de los parámetros de vida y peso larvario del coleóptero acuático *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae), y de *S. frugiperda* que se alimentaban de raíces y hojas (respectivamente) de plantas micorrizadas, lo cual sugiere que los HMA pueden cambiar la resistencia de la planta hacia los insectos.

En general, las raíces tienen una mala calidad nutritiva, y por tanto, es probable que las micorrizas las hagan palatables, debido a sus estructuras, como las vesículas que sirven como almacenes ricos en proteínas, lípidos, fosfolípidos, y ácidos grasos (como el 16: 1ω5) entre otros (Van Aarle y Olsson, 2003). Es probable que debido a la interacción estrecha de *P. vetula* con las plantas, las larvas de este insecto puedan detectar y considerar a las raíces micorrizadas como un mejor alimento y preferirlas.

Las asociaciones micorrízicas modulan la competencia interespecífica entre los insectos herbívoros

Los dos insectos tuvieron un buen desempeño cuando las plantas estaban micorrizadas, por el contrario, cuando las plantas no lo estaban, eran limitadas por recursos teniendo una menor calidad nutricional y, se observó una competencia interespecífica, en la cual, *S. frugiperda* afectó negativamente a *P. vetula*, posiblemente al reducir él envió de carbohidratos a la raíz al alimentarse de las hojas (Denno et al. 1995; Masters et al. 1997). La presencia y ausencia micorrízica en las plantas, tienen efectos que oscilan entre positivos, negativos y neutros, que impactan en el desempeño de los insectos (Gehring y Whitman, 2002).

Cuando las especies compiten por recursos, las teorías de competencia interespecífica pueden explicar los resultados (McClure, 1983) y, en la mayoría de los casos esta se vuelve asimétrica (Denno et al. 1995), es decir que una especie afecta negativamente a otra en un mayor grado (Lawton y Hassell, 1981). Esto último es lo que se observa en el presente estudio.

Es probable explique esta competencia asimétrica, pueda convertirse en una interacción de tipo amensalismo debido a que la gallina ciega presenta efectos negativos (-), y el gusano cogollero al menos efectos neutros (0).

Esta competencia, puede ser debida a nutrientes como el P (como en las plantas micorrizadas). El P, es un elemento inmóvil y es conocido que los HMA son capaces de buscar y proporcionárselo a las plantas (Smith y Read, 2008).

Además, un incremento de P en la dieta de lepidópteros aumenta su desarrollo (Clancy y King, 1993). En este sentido, Perkins et al. (2004) alimentaron a larvas del gusano del tabaco *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) con plantas de *Datura wrightii* Regel (Solanaceae) y observaron, que las larvas tenían más biomasa cuando se alimentaban con plantas con una mayor cantidad de P. También, Janssen (1994) reportó una correlación positiva entre el peso de *Spodoptera exempta* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) y el contenido de P en plantas de maíz. De

la misma manera, Real-Santillán et al. (2019) encontraron en plantas de maíz micorrizadas, una correlación positiva entre la concentración de P y el peso de larvas de *S. frugiperda*.

Por tanto, posiblemente los HMA puedan modular la competencia interespecífica de los insectos, al influir en la calidad nutricional de la planta.

Conclusión

Se concluye que las asociaciones micorrízicas pueden modular mediante la nutrición, la competencia entre los insectos folívoros y rizófagos y volverla asimétrica, cuando la planta es limitada por recursos. También que los HMA, tienen un efecto positivo sobre el desarrollo de los insectos herbívoros. Además, los insectos herbívoros abajo del suelo, pueden impactar negativamente sobre la colonización micorrízica.

Este trabajo proporciona conocimiento, sobre la aun escasa información del efecto de las asociaciones micorrízicas en la interacción de los insectos arriba y abajo del suelo. Finalmente, sugerimos probar esta interacción añadiendo otro nivel trófico, como los enemigos naturales y cuantificando los metabolitos secundarios que participan en la defensa vegetal, en condiciones de campo.

References

- Aguilar, R. (2019). La importancia de la fertilización orgánica en las interacciones bióticas entre Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), Insectos herbívoros y cultivares de maíz. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. p 70.
- Azcón, R., Ambrosano, E., & Charest, C. (2003). Nutrient acquisition in mycorrhizal lettuce plants under different phosphorus and nitrogen concentration. *Plant Science*, 165(5), 1137-1145.
- Bahena, J. F. y Velázquez, G. J. d. J. (2012). Manejo agroecológico en plagas de maíz para una agricultura de conservación en el valle Morelia-Queréndaro, Michoacán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias (INIFAP). Uruapan, Michoacán.
- Barber, N. A., Kiers, E. T., Theis, N., Hazzard, R. V., y Adler, L. S. (2013). Linking agricultural practices, mycorrhizal fungi, and traits mediating plant–insect interactions. *Ecological Applications*, 23(7):1519–1530.
- Bennett, A. E., Alers-Garcia, J., & Bever, J. D. (2005). Three-way interactions among mutualistic mycorrhizal fungi, plants, and plant enemies: hypotheses and synthesis. *The American Naturalist*, 167(2), 141-152.

- Bennett, A. E., Macrae, A. M., Moore, B. D., Caul, S., & Johnson, S. N. (2013). Early root herbivory impairs arbuscular mycorrhizal fungal colonization and shifts defence allocation in establishing *Plantago lanceolata*. *PLoS One*, 8(6), e66053
- Bernaola, L., Rebeca Cosme, M., Schneider, R., & Stout, M. J. (2018). Belowground inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi increases local and systemic susceptibility of rice plants to different pest organisms. *Frontiers in plant science*, 9, 747.
- Bremner, J. M. (1996). Nitrogen-total. *Methods of soil analysis part 3—chemical methods*, (methodsofsoilan3), 1085-1121.
- Brown, V. K., & Gange, A. C. (1990). Insect herbivory insect below ground. In *Advances in ecological research* (Vol. 20, pp. 1-58). Academic Press.
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., & Reinhardt, D. (2018). Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi—From ecology to application. *Frontiers in plant science*, 9.
- Clancy, K. M, y King R (1993) Defining the western spruce budworm's nutritional niche with response surface methodology. *Ecology* 74: 442-454.
- Crawford, N. M., & Glass, A. D. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in plant science*, 3(10), 389-395.
- Denno, R. F., McClure, M. S., & Ott, J. R. (1995). Interspecific interactions in phytophagous insects: competition reexamined and resurrected. *Annual review of entomology*, 40(1), 297-331.
- Dirzo, R. y Domínguez, C. A. (1995). Plant-herbivore interactions in Mesoamerican tropical dry forest. En: Bullock, S. H., Mooney H. A. y Medina, E. (Eds.). *Seasonally Dry Tropical Forest*. Cambridge University Press. pp. 304-325.
- García-Gómez, G. (2019). Efecto de los hongos micorrízicos sobre la herbivoría del gusano cogollero en maíz: adquisición de la infección de un nucleopoliedrovirus. Tesis para obtener el título de Maestra en Producción Agropecuaria opción Área Agrícola. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Gavito, M. E., Jakobsen, I., Mikkelsen, T. N., y Mora, F. (2019). Direct evidence for modulation of photosynthesis by an arbuscular mycorrhiza-induced carbon sink strength. *New Phytologist* 223(2): 896-907.
- Gehring, C., y Bennett, A. (2009). Mycorrhizal fungal-plant-insect interactions: the importance of a community approach. *Environmental Entomology*, 38(1), 93-102.

- Gehring, C. A., & Whitham, T. G. (1991). Herbivore-driven mycorrhizal mutualism in insect-susceptible pinyon pine. *Nature*, 353(6344), 556.
- Gehring, C. A., y T. G. Whitham. (2002). Mycorrhizae-herbivore interactions: population and community consequences, pp. 295, 320. In M. G.A. van der Heijden and I. R. Sanders (eds.), *Mycorrhizal ecology*. Springer, Berlin, Germany.
- Gianinazzi, S., Gollotte., A, Binet., M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., y Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519-530.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84(3): 489-500.
- Graham, J. H. (2000). Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems. *Current advances in mycorrhizae research*, 127-140.
- Graham, J. H., & Eissenstat, D. M. (1998). Field evidence for the carbon cost of citrus mycorrhizas. *The New Phytologist*, 140(1), 103-110.
- Hobbie, E. A., & Colpaert, J. V. (2003). Nitrogen availability and colonization by mycorrhizal fungi correlate with nitrogen isotope patterns in plants. *New Phytologist*, 157(1), 115-126.
- INEGI (2019). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (<https://www.inegi.org.mx/temas/edafologia/>).
- Janssen J. A. M. (1994). Impact of the mineral composition and water content of excised maize leaf sections on fitness of the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research* 84: 233-245.
- Johnson, N. C., Angelard, C., Sanders, I. R., & Kiers, E. T. (2013). Predicting community and ecosystem outcomes of mycorrhizal responses to global change. *Ecology Letters*, 16, 140-153.
- Johnson, N. C., Graham, J. H., & Smith, F. A. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *The New Phytologist*, 135(4), 575-585.
- Kaschuk, G., Kuyper, T. W., Leffelaar, P. A., Hungria, M., & Giller, K. E. (2009). Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1233-1244.
- Klironomos, J. N. (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84(9):2292–2301.

- Kurtz, B., & Vidal, S. (2010). Interaction between western corn rootworm (Coleoptera; Chrysomelidae) and the mycorrhiza *Glomus intraradices*. Interaction of maize root associated fungi and the western corn rootworm, PhD Thesis. University Gottingen Chapter 5. Pp. 81.
- Lawton, J. H., & Hassell, M. P. (1981). Asymmetrical competition in insects. *Nature*, 289(5800), 793.
- Li, H., Smith, F. A., Dickson, S., Holloway, R. E., & Smith, S. E. (2008). Plant growth depressions in arbuscular mycorrhizal symbioses: not just caused by carbon drain? *New Phytologist*, 178(4), 852-862.
- Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2007). Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *science*, 316(5832), 1746-1748.
- 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 Phytologist*, 218(1), 322-334.
- Martínez, R., Tadeo, M., Del Valle, A. P., Espinosa, A., y Solano, A. M. (1999). Rendimiento de nuevos híbridos pumas de maíz para la zona de transición de México. *Agronomía Mesoamericana*, 10, 73-76.
- Masters, G.J. y Brown, V.K. (1997) Host-plant mediated interactions between spatially separated herbivores: effects on community structure. In Gange, A.C. and Brown, V.K., (eds) *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*, Blackwell Science, pp. 217–237.
- Masters, G. J., Brown, V. K., & Gange, A. C. (1993). Plant mediated interactions between above- and below-ground insect herbivores. *Oikos*, 148-151.
- McClure, M. S. (1983). Competition and increased resource heterogeneity. In: Denno, R. and McClure, M. S. (eds). *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*. Academic Press, pp. 125-150.
- Meier, A. R., & Hunter, M. D. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi mediate herbivore-induction of plant defenses differently above and belowground. *Oikos*, 127(12), 1759-1775.
- Morón, M. A. 2010. Diversidad y distribución del complejo gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeoidea). En: Rodríguez, B. L. A., y Morón, M. A. (Eds.). *Plagas del Suelo*. pp. 41-64.
- Murphy, J. & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.

- Nagoshi, R. N., Goergen, G., Tounou, K. A., Agboka, K., Koffi, D., & Meagher, R. L. (2018). Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa. *Scientific reports*, 8(1), 3710.
- Peng, S., Eissenstat, D. M., Graham, J. H., Williams, K., & Hodge, N. C. (1993). Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply (analysis of carbon costs). *Plant Physiology*, 101(3), 1063-1071.
- Phillips, J. M., y Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*, 55(1), 158IN16-161IN18.
- Perkins, M. C., Woods, H. A., Harrison, J. F., Elser, J. J. (2004). Dietary phosphorus affects the growth of larval *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 55: 153-168.
- Pozo, M. J. y Azcón, A. C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current opinion in plant biology*, 10(4):393–398.
- Real-Santillán, R. O., del-Val, E., Cruz-Ortega, M. R., Contreras-Cornejo, A. H., González-Esquível, C. E. y Larsen J. (2019). Increased maize growth and P uptake promoted by arbuscular mycorrhizal fungi coincide with higher foliar herbivory and larval biomass of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Mycorrhiza*. In Prensa.
- Schroeder, M. S., & Janos, D. P. (2004). Phosphorus and intraspecific density alter plant responses to arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, 264(1-2), 335-348.
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, third edition.
- Smith, S. E., Smith, F. A., & Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant physiology*, 133(1), 16-20.
- Tang, X., Ma, Y., Hao, X., Li, X., Li, J., Huang, S., & Yang, X. (2009). Determining critical values of soil Olsen-P for maize and winter wheat from long-term experiments in China. *Plant and Soil*, 323(1-2), 143-151.
- Van Aarle, I. M., & Olsson, P. A. (2003). Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6762-6767.
- Zitlalpopoca-Hernandez, G., Najera-Rincon, M. B., del-Val, E., Alarcon, A., Jackson, T., y Larsen, J. (2017). Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Soil Ecology*, 115, 38-43.

Cuadro 1. Resumen del ANOVA para todas las variables respuestas en: Suelo (con y sin HMA), Gusano cogollero (con y sin *S. frugiperda*) y gallina ciega (con y sin *P. vetula*) (n=6).

Variable	HMA	<i>S. frugiperda</i>	<i>P. vetula</i>	HMA x <i>P. vetula</i>
Peso seo aéreo (g)	$F_{1,40} = 49.8^{***}$	$F_{1,40} = 24.2^{***}$	$F_{1,40} = 7.37^{**}$	
Peso seco radical (g)			$F_{1,40} = 24.2^{***}$	
Respuesta de crecimiento a los HMA (log)		$F_{1,20} = 6.16^*$	$F_{1,20} = 4.65^*$	
Colonización de HMA (%) (arcoseno)			$F_{1,20} = 14.5^{**}$	
Herbivoría (%) (arcsine)	$F_{1,20} = 8.71^{**}$			
Peso de <i>S. frugiperda</i> (g) (log)	$F_{1,20} = 11.9^{**}$			
Peso se <i>P. vetula</i> (g) (log)	$F_{1,20} = 9.44^{**}$			$F_{1,20} = 16.2^{***}$
Nutrición de la planta (mg g ⁻¹)				
Nitrógeno				
Parte aérea	$F_{1,40} = 32.8^{***}$		$F_{1,40} = 13.2^{***}$	
Parte radical	$F_{1,40} = 21.7^{***}$			
Fósforo				
Parte aérea (log)	$F_{1,40} = 74.4^{***}$		$F_{1,40} = 36.3^{***}$	$F_{1,40} = 8.89^{**}$
Parte radical (log)	$F_{1,40} = 29.5^{***}$		$F_{1,40} = 22.5^{***}$	$F_{1,40} = 5.72^*$
Nitrógeno / Fósforo				
Parte aérea	$F_{1,40} = 130.7^{***}$			
Parte radical	$F_{1,40} = 84.6^{***}$		$F_{1,40} = 11.7^{**}$	

*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$. No se muestran efectos no significativos $p \geq 0.05$.

Cuadro 2. Se muestra media y prueba de diferencias mínimas significativas (DMS) de la concentración de Nitrógeno (N) y Fósforo (F) (mg g^{-1}) en la parte aérea y radical de las plantas de maíz en los tres factores: Micorrizas Arbusculares (HMA), *S. frugiperda* (Sf) y *P. vetula* (Pv), (+ con y - sin) y las interacciones entre HMA x Pv. Los efectos no significativos no son mostrados (interacciones: HMA x Sf, Sf x Pv y HMA x Sf x Pv).

(mg g ⁻¹)		HMA		Sf		Pv		HMA x Pv			
		-	+	-	+	-	+	-HMA		+HMA	
								-Pv	+Pv	-Pv	+Pv
N	Parte aérea	18.4 ^a	14.4 ^b	15.9 ^a	16.9 ^a	17.7 ^a	15.2 ^b	19.1 ^a	18.8 ^{ab}	16.3 ^b	12.5 ^c
	Parte radicular	9.25 ^a	7.24 ^b	8.60 ^a	7.88 ^a	8.60 ^a	7.88 ^a	9.22 ^a	9.28 ^a	7.98 ^b	6.49 ^c
P	Parte aérea	0.96 ^b	1.49 ^a	1.19 ^a	1.25 ^a	1.41 ^a	1.04 ^b	1.03 ^{bc}	0.89 ^c	1.79 ^a	1.18 ^b
	Parte radicular	0.44 ^b	0.67 ^a	0.57 ^a	0.54 ^a	0.66 ^a	0.46 ^b	0.47 ^b	0.41 ^b	0.84 ^a	0.51 ^b
N/P	Parte aérea	19.3 ^a	10.1 ^b	14.6 ^a	14.7 ^a	14.0 ^a	15.4 ^a	18.6 ^a	20.0 ^b	9.39 ^b	10.8 ^b
	Parte radicular	21.3 ^a	11.4 ^b	16.7 ^a	16.0 ^a	14.5 ^b	18.2 ^a	19.3 ^b	23.9 ^a	9.74 ^d	13.1 ^c

Letras iguales no son significativamente diferentes en la prueba DMS ($p \geq 0.05$).

Leyenda de figuras

Fig. 1. Se muestra media y error estándar del: peso seco aéreo **A**, **C** and **E**, (suelo, *S. frugiperda* y *P. vetula* respectivamente). Peso seco de las raíces **B**, **D**, **F** (suelo, *S. frugiperda* y *P. vetula* respectivamente). Las plantas de maíz tenían ocho semanas de crecimiento.

Fig. 3. Se muestra media y error estándar de el: porcentaje de herbivoría **A** (suelo). Peso se *S. frugiperda* **B** (suelo), Peso se *P. vetula* **C** (interacciones entre factores). Las plantas de maíz tenían ocho semanas de crecimiento.

Fig. 2. Se muestra media y error estándar de: respuesta del crecimiento a los HMA **A** (*S. frugiperda*) and **B** (*P. vetula*). Las plantas de maíz tenían ocho semanas de crecimiento.

Fig. 4. Se muestra media y error estándar de: Porcentaje de colonización de HMA en las raíces **A** (*S. frugiperda*) and **B** (*P. vetula*). Las plantas de maíz tenían ocho semanas de crecimiento.

Figura 1

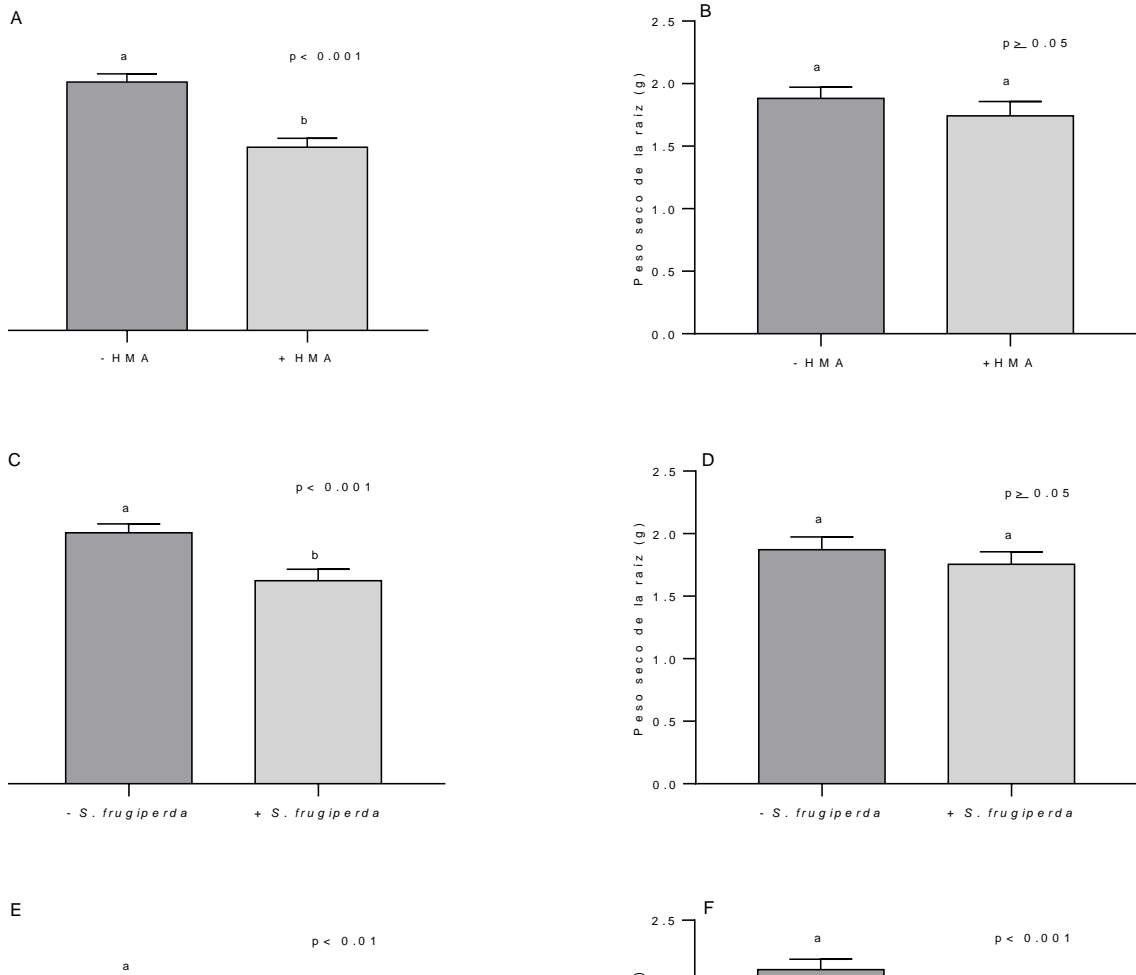


Figura 2

A

B

Figura 3

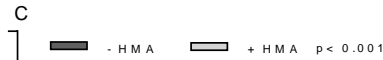
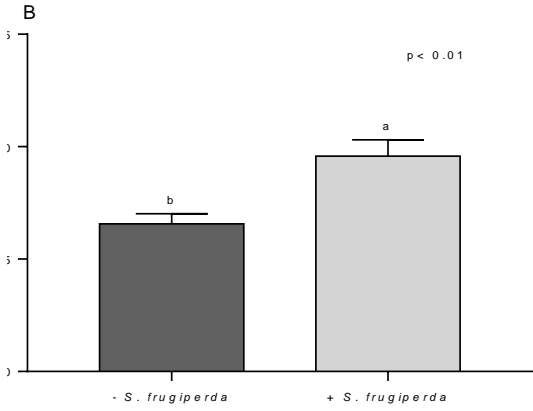
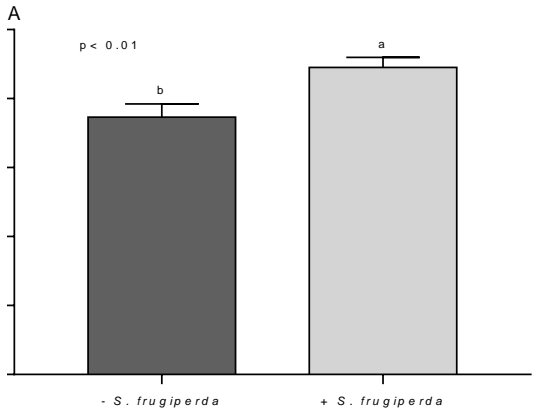


Figura 4



DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERAL



El cultivo de maíz. Códice Florentino.



La milpa. Códice Vindobonensis

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se investigó las interacciones multitróficas entre maíz-HMA e insectos herbívoros. Primero se desarrolló los sistemas base de maíz-insecto herbivoros con diferentes genotipos de maíz en donde los genotipos de maíz nativos mostraron ser más susceptibles al herbivoria foliar por *S. frugiperda*, mientras el efecto de la herbivoria de las raíces por *P. vetula* fue menos evidente. Para la siguiente fase con HMA se incluyó dos genotipos de maíz contrastantes en términos de resistencia a *S. frugiperda* ambos híbridos, PUMA y H318 más y menos resistente respetivamente. Al alterar el fenotipo del hospedero en términos de nutrimentos y crecimiento los HMA indujeron cambios en las plantas de maíz que coincidió con mayor desarrollo de *S. frugiperda* en términos de herbivoria y biomasa de las larvas. Para el experimento sobre interacciones entre los insectos arriba y abajo del suelo y HMA se eligió el genotipo PUMA que presento mayor beneficio por HMA que H318 en cuestión de toma de fosforo. En este experimento nuevamente plantas con HMA fueron más atacados por *S. frugiperda* que resulto en larvas con mayor biomasa que en plantas sin HMA. Por otra parte inoculación con HMA modula las interacciones entre los insectos herbívoros arriba y abajo del suelo mitigando la competencia entre ellos. En el siguiente texto se discute los resultados primero en función de genotipos de maíz y después con sus interacciones individuales con los HMA e los insectos herbívoros.

6.1 Genotipos de maíz y herbivoría por insectos

En general las variedades nativas presentaron un mayor desarrollo que las híbridas. Esta diferencia puede ser debida a su propio genotipo, puesto que los maíces nativos o criollos son seleccionados principalmente por su altura y mayor biomasa, ya que muchos se usan como forraje. En cambio, los genotipos híbridos, son seleccionados para que produzcan una mayor cantidad de grano, e incluso, es apreciado que tengan un menor tamaño. Estos resultados, coinciden con lo reportado por Elizondo-Salazar y Boschini-Figueroa (2002) y Sánchez-Hernández et al. (2013) quienes encontraron, una mayor producción de biomasa en genotipos nativos que en híbridos.

Las larvas de *S. frugiperda* por lo general ocasionaron diferente herbivoría en las variedades de maíz. Por ejemplo, en los maíces nativos el daño fue mayor comparado con los híbridos. Se conoce que las variedades híbridas son seleccionadas a través una intensa domesticación, para que resistan a los insectos herbívoros (Rosenthal y Dirzo, 1997). El efecto y

grado de herbivoría en el maíz, depende de la variabilidad del genotipo y de la especie de insecto (Farias-Rivera et al. 2003).

Lo anterior contrasta con lo señalado por Szczepaniec et al. (2013), quienes mencionaron que las variedades nativas al ser más cercanas al ancestro *Teocintle* sp. pueden presentar una mayor defensa hacia los insectos, debido a que los genes de defensa están activos. Por lo tanto, los materiales híbridos se han seleccionado en aras de una mayor producción sin importar la defensa.

6.2 Interacciones maíz-HMA

Por otra parte, las asociaciones micorrízicas tuvieron efectos ambiguos en las plantas a través de los experimentos. En el segundo capítulo, los HMA afectaron positivamente el desarrollo de las plantas y, por el contrario, en el tercero, los HMA tuvieron un efecto negativo en el crecimiento causando una supresión del crecimiento en el maíz, que se manifestó en un menor tamaño comparado con las plantas sin micorrizar.

No obstante, no siempre las micorrizadas llegan a desarrollarse mejor (Smith et al. 2003). Cuando los HMA y las plantas hospederas inician el proceso de colonización, las plantas transfieren grandes cantidades de carbohidratos en el establecimiento de la simbiosis y esto, al menos al inicio, puede superar los beneficios que recibe la planta de los HMA (Peng et al. 1993; Graham y Eissenstat, 1998; Li et al. 2008). Posiblemente al inicio de la colonización micorrízica en las raíces, los HMA actuarían más como un parasito o un mutualista débil (Johnson et al. 1997), debido a que las interacciones micorrízicas pueden ser un continuo, que va desde el mutualismo al parasitismo (Klironomos, 2003).

Sin embargo, es probable que este efecto sea sólo transitorio tal como lo señalaron Schroeder y Janos (2004) y, además, es posible que estos “sumideros de C” puedan estimular la fotosíntesis (Gavito et al. 2019). Por lo tanto, estas depresiones de crecimiento no deben ser causa de preocupación, debido a que son transitorias y es más importante los servicios ecosistémicos que los HMA confieren, como lo es la salud y la nutrición vegetal (Gianinazzi et al., 2010).

En cuestión de nutrientes plantas de maíz con HMA resultaron tener mayor concentración de fosforo en ambas hojas y raíces independientemente de la respuesta del crecimiento vegetal por los HMA como igual reportado por Smith et al. (2003).

En el caso de la colonización micorrízica, se encontró que las variedades nativas de maíz presentaron ligeramente una mayor colonización que las híbridas. En concordancia a este trabajo, Sangabriel-Conde et al. (2014), al trabajar con diversas variedades, observaron que los genotipos nativos presentaban una mayor colonización micorrízica. En contraste, Aguilar et al. (2019), al trabajar con cuatro variedades de maíz; dos híbridas y dos nativas, observaron, que las variedades nativas presentaron una menor colonización. Por tanto, el grado en que los HMA colonizan a las raíces, dependerá, de su variación genética, tipo de germoplasma y localidad de origen (An et al. 2010; Sangabriel-Conde et al. 2014).

6.3 Interacciones maíz-HMA e insectos herbívoros

6.3.1 Efecto de los HMA sobre la defensa vegetal

Los HMA en general, mejoran la calidad nutricional de las plantas al explorar el suelo en busca de agua, nutrientes inmóviles y transportarlos a las raíces (Smith y Read, 2008). Así, al mejorar la calidad nutricional es que los HMA impactan a las plantas y a los insectos herbívoros que se alimentan de sus tejidos, debido a que estos son sensibles a las concentraciones de nutrientes de su planta hospedera. Estos cambios en los nutrientes pueden tener influencia en diversos aspectos fisiológicos y ecológicos en los insectos, como la selección de la planta hospedera, la supervivencia y la reproducción (Gershenson, 1984; Borowicz, 1997). Por ejemplo, un aumento en el contenido de fósforo en la planta puede tener como resultado una ganancia de peso en los lepidópteros (Janssen, 1994; Perkins et al. 2004). También es muy conocida la influencia de una mayor cantidad de N sobre los insectos (Schonhoven, 2006).

En este trabajo, en general los insectos se desarrollaron mejor en plantas micorrizadas, y posiblemente que cuando se encontraban los HMA, se haya dado una defensa por tolerancia. La tolerancia es una parte de la defensa, en la cual las plantas pueden soportar y recuperarse del efecto negativo de la herbivoría sin que les sea perjudicial (Wang et al. 2018). Este tipo de defensa es muy compleja y se puede deber al sistema de estudio, a la limitación de recursos, a los costos reproductivos, al genotipo de la planta y a factores bióticos y abióticos (Núñez-Farfán et al. 2007; Fornoni, 2011). Por tanto, las asociaciones micorrízicas pueden suavizar los efectos negativos de la herbivoría, al compensar a las plantas con nutrientes (Garrido et al. 2010; Borowicz, 2013). A este respecto Coley et al. (1985) y Blossey y Hunt-Joshi, (2003), mencionaron, que los efectos

negativos de la herbivoría pueden ser atenuados cuando la planta tiene una mejor calidad nutricional.

Por otra parte, también se encontró defensa por resistencia hacia los insectos cuando hay una mala nutricional en plantas sin micorrizar. En general, el maíz presentaba clorosis debido a una menor concentración de N y las plantas mostraban un aspecto amarillento y translucido. A este respecto, se conoce que el estrés por nutrientes puede alterar la producción de metabolitos secundarios, tales como los fenoles que tienden a incrementarse (Chishaki y Horigushi, 1997) y que aumentan la resistencia hacia los insectos (Tingey y Singh, 1980). Estos metabolitos secundarios, no solamente tienen una función en la defensa, sino que también un efecto fotoinhibidor, debido a que protegen a la planta contra la radiación ultravioleta, radicales libres y estrés oxidativo (Close et al. 2003, Moore et al. 2004; Fortier et al. 2006).

6.3.2 Efecto de los HMA sobre las interacciones entre insectos herbívoros arriba y bajo del suelo

Es probable que los HMA puedan mediar la competencia interespecífica de los insectos. Esto se observó cuando en el sistema se probaron dos especies de insectos masticadores. Esta competencia también está influida por la mejor nutrición proporcionada por los HMA. Por ejemplo, cuando las plantas eran micorrizadas, generalmente presentaban una mejor calidad nutricional y esto hizo que los dos insectos se beneficiaran aumentando su biomasa. Sin embargo, cuando las asociaciones micorrízicas estaban ausentes, la nutrición vegetal era menor y se observó una competición por recursos (McClure, 1983) y que se volvió asimétrica (Lawton y Hassell, 1981) en la que los insectos foliares afectaron negativamente a los del del suelo al disminuir su desarrollo. Es probable que esta competencia asimétrica sea debida a una interacción de tipo amensalismo, puesto que *S. frugiperda* no se observó ningún cambio, pero por el contrario *P. vetula* si fue afectada negativamente en su desarrollo.

6.4 Efecto de los insectos herbívoros sobre las asociaciones micorrízicas

Con relación a los insectos herbívoros, estos, influyeron positiva o negativamente sobre la colonización. Por ejemplo, en el segundo capítulo, las larvas de *S. frugiperda* estimularon una mayor colonización cuando se alimentaban de la variedad híbrida.

Sin embargo, *P. vetula* cuando se alimentó de las raíces tuvo un efecto negativo sobre la biomasa del maíz, al reducir su crecimiento, además es necesario destacar prefirió consumir raíces micorrizadas. Otros trabajos también han encontrado una menor cantidad de raíces micorrizadas cuando se encuentra *P. vetula* (Zitlalpopoca et al. 2017). Es probable que las raíces micorrizadas sean más palatables, al contener estructuras propias de los HMA ricas en nutrientes, por ejemplo, de vesículas, cuya función es ser un almacén de recursos como diferentes tipos de lípidos.

7. CONCLUSIÓN

Contrario a nuestra hipótesis inicial, en la que las asociaciones micorrizas ayudarían a la planta a resistir el ataque de los insectos herbívoros que se alimentan de las hojas y las raíces, este trabajo muestra que plantas con HMA fueron más atacadas por *S. frugiperda* que de igual manera resulto en larvas con mayor biomasa, cuando se alimentaron de plantas micorrizadas.

La respuesta de la planta por la herbivoría de los insectos dependió del genotipo del maíz. Las variedades híbridas fueron menos atacadas por *S. frugiperda* que las nativas. En cuestión de herbivoría por *P. vetula* la importancia del genotipo del maíz fue menos notoria.

Las asociaciones micorrízicas ayudaron la planta hospedera a tolerar el ataque de los insectos, al mejorar su calidad nutricional. Sin embargo, su presencia no activó el sistema de defensa de las plantas que inducen a la resistencia. Es probable que los HMA puedan modular las interacciones de competencia interespecífica entre especies de insectos separadas espacialmente, pero que comparten el mismo hospedero.

Este trabajo contribuye a ampliar el conocimiento sobre la aun escasa información de las interacciones multitróficas, entre HMA e insectos herbívoros mediadas por la planta de maíz. Así mismo, los resultados alcanzados pueden servir para considerar estrategias para un futuro control sustentable de plagas. Sin embargo, aún es necesario, realizar más estudios, en donde se ponga a prueba esta interacción en escenarios de campo y donde se evalúen los compuestos defensivos de la planta.

8. REFERENCIAS GENERALES

- Aditya, S., y Singh, S. P. (2019). Fall army worm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) new formidable challenge pest in maize crop: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 7(3): 2537-2539.
- 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. *Journal of Phytopathology*, 165(7-8), 448-454.
- Aguilar, R. (2019). La importancia de la fertilización orgánica en las interacciones bióticas entre Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), Insectos herbívoros y cultivares de maíz. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. p 70.
- Álvarez-Buylla. E. C., Carreón, G. A. y San Vicente, T. A. (2011). Haciendo milpa. La protección de las semillas y la agricultura campesina. Universidad Nacional Autónoma de México y Semillas de Vida, A.C. México. pp. 5-21.
- An, G. H., Kobayashi, S., Enoki, H., Sonobe, K., Muraki, M., Karasawa, T., y Ezawa, T. (2010). How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (*Zea mays*) germplasms. *Plant and Soil*, 327(1-2):441-453.
- Aragón, G. A., Pérez-Torres, B. C., Morón, M. A., López, O. J. F., y Tapia-Rojas, A. M. (2006). Desarrollo biológico y comportamiento de cinco especies del género *Phyllophaga* (Harris, 1827) (Coleoptera: Melolonthidae Melonlonthinae). In Castro-Ramírez, Morón, M. A. and Aragón, A., editors, *Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas*, pages 49–62. El Colegio de la Frontera Sur, la fundación PRODUCE Chiapas, A. C. y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, first edition.
- Aydinsakir, K., Erdal, S., Buyuktas, D., Bastug, R. y Toker, R. (2013). The influence of regular deficit irrigation applications on water use, yield, and quality components of two corn (*Zea mays* L.) genotypes. *Agricultural water management*, 128:65–71.
- Bahena, J. F. y Cortez, M. E. (2015). Gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). In Arredondo, B. H. C. y Rodríguez, d. B. L. A., editors, *Casos de control biológico en México*, 2:181–250. Biblioteca Básica de Agricultura, first edition.
- Bahena, J. F., y Velázquez, G. J de J. (2012). Manejo agroecológico en plagas de maíz para una agricultura de conservación en el valle Morelia-Queréndaro. INIFAP. CIRPAC. *Folleto Técnico* No. 27. Uruapan, Michoacán, México. 81p.

- Barber, N. A. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi are necessary for the induced response to herbivores by *Cucumis sativus*. *Journal of Plant Ecology*, 6(2):171–176.
- Bennett, A. E. y Bever, J. D. (2007). Mycorrhizal species differentially alter plant growth and response to herbivory. *Ecology*, 88(1):210–218.
- Bi, H., Song, Y., y Zeng, R. (2007). Biochemical and molecular responses of host plants to mycorrhizal infection and their roles in plant defence. *Allelopathy Journal*, 20(1):15.
- Blossey, B. y Hunt-Joshi, T. R. (2003). Belowground herbivory by insects: influence on plants and aboveground herbivores. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 521-547.
- Borowicz, V. A. (1997). A fungal root symbiont modifies plant resistance to an insect herbivore. *Oecologia*, 112(4), 534-542.
- Borowicz, V. A. (2013). The impact of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth following herbivory: a search for pattern. *Acta oecologica*, 52: 1-9.
- Chishaki, N. y Horiguchi, T. (1997). Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43(sup1), 987-991.
- Close, D., McArthur, C., Paterson, S., Fitzgerald, H., Walsh, A., y Kincade, T. (2003). Photoinhibition: a link between effects of the environment on eucalypt leaf chemistry and herbivory. *Ecology*, 84(11), 2952-2966.
- Coley, P. D., Bryant, J. P., y Chapin, F. S. (1985). Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230(4728), 895-899.
- Del-Val, E. (2012). Herbivoría. In Del-Val, E. y Boege, K., editors, *Ecología y evolución de las interacciones bióticas*, pages 43–74. Ediciones Científicas Universitarias, first edition.
- Del-Val, E. y Boege, K. (2012). ¿Por qué estudiar las interacciones bióticas? In Del-Val, E. y Boege, K., editors, *Ecología y evolución de las interacciones bióticas*, pages 140–174. Ediciones Científicas Universitarias, first edition.
- Elizondo-Salazar, J. A. y Boschini-Figueroa, C. (2002). Producción de forraje con maíz criollo y maíz híbrido. *Agronomía Mesoamericana*, 13(1):13–17.
- Erb, M., Flors, V., Karlen, D., De Lange, E., Planchamp, C., D'Alessandro, M., Turlings, T. C., y Ton, J. (2009). Signal signature of aboveground-induced resistance upon belowground herbivory in maize. *The Plant Journal*, 59(2):292–302.
- Farias-Rivera, L. A., Hernandez-Mendoza, J. L., Molina-Ochoa, J., y Pescador-Rubio, A. (2003). Effect of leaf extracts of teosinte, *Zea diploperennis* L., and a Mexican maize variety, criollo 'Uruapeño', on the growth and survival of the Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 86(3), 239-244.

- Fernández-Aulis, M. F. (2012). Aplicación de tecnologías emergentes para extracción óptima de antocianinas del totomoxtle y olote de maíz criollo morado. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fornoni, J. (2011). Ecological and evolutionary implications of plant tolerance to herbivory. *Functional Ecology*, 25(2), 399-407.
- Fortier, E., Desjardins, Y., Tremblay, N., Bélec, C., y Côté, M. (2006). Influence of irrigation and nitrogen fertilization on broccoli polyphenolics concentration. In *International Symposium on Vegetable Safety and Human Health* 856. pp. 55-62.
- García-Gómez, G. (2019). Efecto de los hongos micorrízicos sobre la herbivoría del gusano cogollero en maíz: adquisición de la infección de un nucleopoliedrovirus. Tesis en proceso para obtener el título de Maestra en Producción Agropecuaria opción Área Agrícola. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- García-Montalvo, I. A. (2016). Mecanismos de resistencia a patógenos e insectos herbívoros en teosinte y maíz. *Journal of Negative and No Positive Results: Journal of Negative and No Positive Results*, 1(5), 190-198.
- Garrido, E., Bennett, A. E., Fornoni, J., y Strauss, Y. (2010). Variation in arbuscular mycorrhizal fungi colonization modifies the expression of tolerance to above-ground defoliation. *Journal of Ecology*, 98(1):43–49.
- Gavito, M. E., Jakobsen, I., Mikkelsen, T. N., y Mora, F. (2019). Direct evidence for modulation of photosynthesis by an arbuscular mycorrhiza-induced carbon sink strength. *New Phytologist* 223(2): 896-907.
- Gehring, C. y Bennett, A. (2009). Mycorrhizal fungal-plant-insect interactions: the importance of a community approach. *Environmental Entomology*, 38(1):93–102.
- Gehring, C. A. y Whitham, T. G. (2002). Mycorrhizae herbivore interactions: population and community consequences. In *Mycorrhizal ecology*, pages 295–320. Springer.
- Gianinazzi, S., Gollotte., A, Binet., M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., y Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519-530.
- Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., y Tamò, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central África. *PloS one*, 11(10):e0165632.
- Gershenson, J. (1984). Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. In *Phytochemical adaptations to stress* (pp. 273-320). Springer, Boston, MA

- Graham, J. H., y Eissenstat, D. M. (1998). Field evidence for the carbon cost of citrus mycorrhizas. *The New Phytologist*, 140(1), 103-110.
- Hartley, S. E. y Gange, A. C. (2009). Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual review of entomology*, 54:323–342.
- Hellin, J. y Keleman, A. (2013). Las variedades criollas del maíz, los mercados especializados y las estrategias de vida de los productores. *LEISA Revista de agroecología*, 29(2), 9-14.
- Hernández-Cruz, J. (2010). Caracterización y evaluación de las especies de *Phyllophaga* Harris (Coleoptera: Melolonthidae) en Santa Cruz Xoxocotlan Oaxaca. Master's thesis, Centro Interdisciplinario De Investigación Para El Desarrollo Integral Regional (CIIDIR). Unidad Oaxaca. Instituto Politécnico Nacional.
- Jakobsen, I., y Rosendahl, L. (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist*, 115(1), 77-83.
- Janssen, J. A. M. (1994). Impact of the mineral composition and water content of excised maize leaf sections on fitness of the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 84(2), 233-245.
- Johnson, N. C., Graham, J. H., y Smith, F. A. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *The New Phytologist*, 135(4), 575-585.
- Klironomos, J. N. (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84(9):2292–2301.
- Koricheva, J., Gange, A. C., y Jones, T. (2009). Effects of mycorrhizal fungi on insect herbivores: a metaanalysis. *Ecology*, 90(8):2088–2097.
- Lawton, J. H., y Hassell, M. P. (1981). Asymmetrical competition in insects. *Nature*, 289(5800), 793.
- Li, H., Smith, F. A., Dickson, S., Holloway, R. E., y Smith, S. E. (2008). Plant growth depressions in arbuscular mycorrhizal symbioses: not just caused by carbon drain? *New Phytologist*, 178(4), 852-862.
- Llamas-Guzmán, L. P. (2016). Expresión de la resistencia a tolerancia a variedades de maíz nativo y comercial ante el daño causado por el herbívoro generalista *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Master's thesis. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México pp.76.
- McClure, M. S. (1983). Competition and increased resource heterogeneity. In: Denno, R. and McClure, M. S. (eds). *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*. Academic Press, pp. 125-150.
- McConnell, R., y Hruska, A. J. (1993). An epidemic of pesticide poisoning in Nicaragua: implications for prevention in developing countries. *American journal of public health*, 83(11), 1559-1562.

- Meléndez, P. C. O., Quintero, R. A., Ruiz, G. M. G., y Camacho, D. A. (2014). Del maíz a la tortilla: nixtamalización. *Synthesis Digital*, 1:37–39.
- Mithöfer, A. y Maffei, M. E. (2016). General mechanisms of plant defense and plant toxins. In *Plant Toxins*, pages 1–22. Springer.
- Moore, B. D., Wallis, I. R., Wood, J. T., y Foley, W. J. (2004). Foliar nutrition, site quality, and temperature influence foliar chemistry of tallowwood (*Eucalyptus microcorys*). *Ecological Monographs*, 74(4), 553-568.
- Morón, M. A. (2006). Composición de comunidades de *Phyllophaga* en México (Coleoptera: Melolonthidae: Melonlonthinae). In Castro-Ramírez, Morón, M. A. and Aragón, A., editors, *Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas*, pages 11–36. El Colegio de la Frontera Sur, la fundación PRODUCE Chiapas, A. C. y la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, first edition.
- Morón, M. A. (2010). Diversidad y distribución del complejo ‘gallina ciega’ (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Plagas del suelo. Mundi-Prensa, México*, pages 41–63.
- Muñoz, O. A., Cuevas, S. J. A., Miranda, C. S., Molina, G. J. y Santacruz, V. A. (2005). Prehistoria e historia del progreso de la diversidad. In Muñoz, O. A. Editor. *Centli Maíz* Pages 11-12. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco. Edo. De México. Five edition.
- Murrell, E. G., Hanson, C. R., & Cullen, E. M. (2015). European corn borer oviposition response to soil fertilization practices and arbuscular mycorrhizal colonization of corn. *Ecosphere*, 6(6), 1-12.
- Murrell, E. G., Ray, S., Lemmon, M. E., Luthe, D. S., & Kaye, J. P. (2019). Cover crop species affect mycorrhizae-mediated nutrient uptake and pest resistance in maize. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 1-8.
- Nagoshi, R. N., Goergen, G., Tounou, K. A., Agboka, K., Koffi, D., & Meagher, R. L. (2018). Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa. *Scientific reports*, 8(1), 3710.
- Nexticapan-Garcéz, A., Magdub-Méndez, A., Vergara- Yoisura, S., Martin-Mex, R., y Larqué-Saavedra, A. (2009). Fluctuación poblacional y daños causados por gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) en maíz cultivado en el sistema de producción continúa afectado por el huracán Isidoro. *Universidad y ciencia*, 25(3):273–277.
- Núñez-Farfán, J., Fornoni, J., y Valverde, P. L. (2007). The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 541-566.

- Peng, S., Eissenstat, D. M., Graham, J. H., Williams, K., y Hodge, N. C. (1993). Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply (analysis of carbon costs). *Plant Physiology*, 101(3), 1063-1071.
- Pérez-Agis, S. E. (2001). Fluctuación de la población de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) en dos sistemas de manejo para la producción de maíz en Michoacán. Master’s thesis. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad d Guadalajara pp. 71.
- Pérez-Constantino, A. (2015). Insectos fitófagos asociados a maíces criollos de an Juan Ixtenco, Tlaxcala. Master’s thesis, Postgrado en fitosanidad. Entomología y Acaralogía. Colegio de Postgraduados.
- Perkins, M. C., Woods, H. A., Harrison, J. F., y Elser, J. J. (2004). Dietary phosphorus affects the growth of larval *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 55(3), 153-168.
- Pogue MA. (2002). World revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the American Entomological Society* 43:1-202.
- Pozo, M. J. y Azcón, A. C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current opinion in plant biology*, 10(4):393–398.
- Pozo, M. J., Van Loon, L., y Pieterse, C. M. (2004). Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(3):211–222.
- Price, P. W. (2004). Species interactions and the evolution of biodiversity. In Herrera, C. M. and Olle, P., editors, *Plant- Animal Interactions. An Evolutionary Approach*, pages 3–25. Blackwell Publishing.
- Rabin, L. y Pacovsky, R. (1985). Reduced larva growth of two lepidoptera (noctuidae) on excised leaves of soybean infected with a mycorrhizal fungus. *Journal of Economic Entomology*, 78(6):1358–1363.
- Rosenthal, J. P. y Dirzo, R. (1997). Effects of life history, domestication and agronomic selection on plant defence against insects: evidence from maizes and wild relatives. *Evolutionary Ecology*, 11(3):337–355.
- Sánchez-Hernández, M. A., Aguilar Martínez, C. U., Valenzuela Jiménez, N., Joaquín Torres, B. M., Sánchez Hernández, C., Jiménez Rojas, M. C., y Villanueva Verduzco, C. (2013). Forage yield in response to sowing density in eight corn (*Zea mays*) genotypes in the humid tropics of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(3): 271-288.
- Sangabriel-Conde, W., Negrete-Yankelevich, S., Maldonado-Mendoza, I. E., y Trejo-Aguilar, D. (2014). Native maize landraces from Los Tuxtlas, México show varying mycorrhizal dependency for P uptake. *Biology and fertility of soils*, 50(2):405-414.

- Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J. A. y Dicke, M. 2006. Plant as insect food: not the ideal. En: Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J. A. y Dicke, M. (Eds.). *Insect-Plant Biology*. Oxford Academic Press pp. 99-127.
- Schroeder, M. S., y Janos, D. P. (2004). Phosphorus and intraspecific density alter plant responses to arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, 264(1-2), 335-348.
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, third edition.
- Smith, S. E., Smith, F. A., y Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant physiology*, 133(1), 16-20.
- Speight, M., Hunter, M., y Watt, A. (2008) Ecology of insects: concepts and applications. Oxford University Press, Oxford, p 628.
- Szczepaniec, A., Widney, S. E., Bernal, J. S., y Eubanks, M. D. (2013). Higher expression of induced defenses in teosintes (*Zea* spp.) is correlated with greater resistance to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146(2):242–251.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). *Fisiologia vegetal*, volumen 10. Universitat Jaume I.
- Tingey, W. M., y Singh, S. R. (1980). Environmental factors influencing the magnitude and expression of resistance. *Breeding plants resistant to insects*, 87.
- Van Dam, N. M., Harvey, J. A., Wäckers, F. L., Bezemer, T. M., van der Putten, W. H., y Vet, L. E. (2003). Interactions between aboveground and belowground induced responses against phytophages. *Basic and Applied Ecology*, 4(1):63–77.
- Wang, L., Pokharel, S. S., & Chen, F. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) alter the food utilization, growth & development and reproduction of armyworm, *Mythimna separata* fed on Bt maize (No. e27643v1). PeerJ Preprints.
- Wang, S., Ding, T., Xu, M., y Zhang, B. (2018). Bidirectional interactions between beet armyworm and its host in response to different fertilization conditions. *PloS One* 13: e0190502
- Zitlalpopoca-Hernandez, G., Najera-Rincon, M. B., Del-Val, E., Alarcon, A., Jackson, T., y Larsen, J. (2017). Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Soil Ecology*, 115, 38-43.