



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
ECOLOGÍA

**RESPUESTA DE MICORRIZAS DE MAÍZ (*Zea mays*) A UN
GRADIENTE DE ESTRÉS HÍDRICO Y FERTILIZACIÓN MINERAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DANTE ALEJANDRO LÓPEZ CARMONA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JOHN LARSEN
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
COMITÉ TUTOR: Dr. ALEJANDRO ALARCÓN
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, MONTECILLO.
Dr. ERICK DE LA BARRERA MONTPPELLIER
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2013



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
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
ECOLOGÍA

**RESPUESTA DE MICORRIZAS DE MAÍZ (*Zea mays*) A UN
GRADIENTE DE ESTRÉS HÍDRICO Y FERTILIZACIÓN MINERAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

DANTE ALEJANDRO LÓPEZ CARMONA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JOHN LARSEN
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
COMITÉ TUTOR: Dr. ALEJANDRO ALARCÓN
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, MONTECILLO.
Dr. ERICK DE LA BARRERA MONTPPELLIER
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2013



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de agosto del 2013, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestro en Ciencias Biológicas del alumno **Dante Alejandro López Carmona** con número de cuenta 512012218 con la tesis titulada: **"Respuesta de micorrizas de maíz (*Zea mays*) a un gradiente de estrés hídrico y fertilización mineral"** bajo la dirección del Dr. John Larsen.

Presidente:	Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez
Vocal:	Dra. María del Rocío Cruz Ortega
Secretario:	Dr. Erick de la Barrera Montppellier
Suplente:	Dra. Marta Astier Calderón
Suplente:	Dr. Roberto Antonio Lindig Cisneros

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 4 de octubre del 2013.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por darme la oportunidad de formarme como Maestro en Ciencias. También quiero agradecer a Lilia Judith Espinosa Sánchez, por su gran apoyo en todos los trámites y procedimientos administrativos durante mi estancia en el posgrado.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca para la realización de mis estudios de posgrado (CVT/becario: 413180/262648). De igual modo quiero agradecer el financiamiento que me otorgó el proyecto: SEP-CONACY T2012-179319 “Importancia de los microbios benéficos de la rizósfera en la producción sustentable de maíz”

Quiero agradecer, al Dr. John Larsen por haberme abierto las puertas del Laboratorio de Agroecología y por brindarme toda su confianza para poder realizar mi proyecto de investigación bajo su tutoría.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por su paciencia y contribución en la elaboración del presente documento, y por haberme dado la oportunidad de realizar los análisis de contenido de prolina en el laboratorio del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados campus Montecillo.

Al Dr. Erick de la Barrera Montpellier, por sus aportaciones durante la realización de la investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A todos los compañeros del laboratorio: Semiramis, Andrea, Omar, Guadalupe, Jazmín, “Angy”, Ricardo, Dainiz, Marcela, Abraham, Carlos, Miguel, John porque compartir con ustedes las actividades académicas se volvió más fácil alcanzar las metas. Gracias a todos por su apoyo y contribuciones durante las cosechas, en tutorales, en seminarios, en festejos y sobretodo en las largas horas y horas de reuniones dentro y fuera del laboratorio.

A mi familia, especialmente a mi tía Ceci y mi abuela Belem por alentarme a seguir adelante a pesar los contratiempos y distancias.

A mi madre y hermanos Mayo y Diego, porque regresar a casa ha significado más que estudiar, sino estrechar lazos y apoyo entre familia.

A mi padre y herman@s Arafat, Alexa y Vanzetti.

A Margarita por darme por su apoyo e ideas en la redacción de la tesis.

Finalmente al “Chester” y “Simon” porque ellos fueron el pretexto ideal para caminar en el cerro, en donde tuve la oportunidad de pensar libremente en la forma de abordar y escribir mi tesis.

DEDICATORIA

A la vida

A la familia

A la amistad y el compañerismo

Especialmente a mi tía Ana† y mi abuela Belem

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE ANEXOS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis.....	2
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivos específicos	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. Generalidades de los hongos micorrícicos	3
3.2. Tipos de asociaciones micorrícicas	3
2.2.1. Hongos micorrícicos arbusculares	4
2.3. Relaciones entre los HMA y las plantas.....	7
2.3.1. El papel de los HMA en la reducción del estrés en maíz.....	7
2.3.2. Contribución de los HMA en la nutrición de las plantas	8
2.3.3. Los HMA en la salud de las plantas.....	9
2.4. Comunidades de HMA en los agroecosistemas	9
2.5. Estrés hídrico en plantas	10
2.5.1. La Prolina como regulador osmótico ante el estrés hídrico	12
2.6. El maíz	12
2.7. Las micorrizas y diferentes cultivos	13
3. METODOLOGÍA	15
3.1. Materiales biológicos	15
3.1.1. Determinación de morfotipos del inóculo nativo	16
3.2. Elaboración y manejo del sustrato	18
3.2.1. Estimación de la capacidad de campo del suelo	18
3.3. Diseño experimental	18
3.3.1. Efecto de la irrigación sobre el desarrollo de HMA en maíz.....	20
3.3.2. Efecto de la fertilización mineral en el desarrollo de HMA en maíz	20
3.3.3. Evaluación de la interacción entre estrés hídrico y fertilización mineral en el desarrollo de HMA y maíz híbrido.	21
3.4. Condiciones de crecimiento de las plantas	22
3.5. Variables.....	22
3.5.1. Evaluación del desempeño vegetal	22
3.5.2. Coeficiente alométrico entre el raíz/ follaje (parte aérea).....	23
3.5.3. Estimación del contenido de prolina.....	23

3.5.4.	Evaluación de la colonización micorrícica	24
3.6.	Análisis estadístico	25
4.	RESULTADOS	26
4.1.	Identificación de morfotipos del inóculo nativo	28
4.2.	Efecto de tres niveles de irrigación en el desarrollo de HMA en maíz.....	30
4.3.	Efecto de la fertilización mineral en el desarrollo de HMA en maíz	37
4.4.	Evaluación de la interacción entre estrés hídrico y fertilización mineral en el desarrollo de HMA y maíz híbrido.	44
5.	DISCUSIÓN	56
	Efecto de la irrigación sobre el desempeño vegetal del maíz	56
	Efecto de la fertilización sobre el desempeño vegetal del maíz	57
	Diversidad de hongos micorrícicos del inóculo nativo	58
	Interacción de la colonización micorrícica con el desempeño vegetal	59
	Efecto de la irrigación sobre el desarrollo de HMA	60
	Efecto de la fertilización sobre la colonización micorrícica.....	61
	Interacción de la fertilización y la irrigación sobre el desarrollo del maíz híbrido micorrizado	62
6.	CONCLUSIONES	65
7.	EXPECTATIVAS Y LIMITACIONES	66
8.	LITERATURA CITADA	67
9.	ANEXOS	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características generales de los hongos micorrícicos tomada de Smith y Read (2008).	4
Cuadro 2. Efecto en plantas de diferentes hongos micorrícicos arbusculares (HMA) sobre diferentes especies de interés agrícola.....	14
Cuadro 3. Diseños experimentales de las tres etapas de evaluación	19
Cuadro 4. Macro y micro nutrientes utilizados en los tratamientos de fertilización.	20
Cuadro 5. Estructuras de hongos micorrícicos arbusculares de raíces de maíz híbrido micorrizado.....	27
Cuadro 6. Morfotipos encontrados en el suelo utilizado como inóculo nativo.	28
Cuadro 7. Valores de p del análisis de varianza para el desempeño vegetal y colonización de raíces bajo tres tratamientos de irrigación. $*=p \leq 0.05$, $***=p \leq 0.01$	30
Cuadro 8. Valores de p del análisis de varianza para el desempeño vegetal y colonización de raíces bajo tratamientos de fertilización. $*=p \leq 0.05$, $***=p \leq 0.01$	37
Cuadro 9. Valores de p de un análisis de análisis de varianza de la interacción entre el inóculo, fertilización e irrigación para el desempeño vegetal y colonización de raíces bajo. $*p \leq 0.05$ $*** p \leq 0.01$	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ciclo de vida de los Hongos micorrícicos arbusculares, modificado de Requena <i>et al.</i> , 2007.....	6
Fig. 2. Proceso de extracción e identificación de morfotipos del inóculo nativo. En la sección “A” se ilustra el proceso de extracción de esporas (a) peso de suelo; (b) hidratación del suelo; (c) aplicación de peróxido de hidrógeno; (d) mezclado del suelo en licuadora; (e) tamizado del suelo hasta obtener el de 35 micras; (f) centrifugación de los tamizados a 1000 rpm; (g) colocación de azúcar al 50% y tamizado del sobrenadante; (i) obtención del extracto de esporas. En la sección “B”) Colocación y separación del extracto; II) Extracción de esporas turgentes del resto de esporas; III) clasificación de esporas por morfa, color y tamaño semejantes; IV) Montaje de esporas en PLVG y PLVG+ solución Melzer; V) Espora aislada.	17
Fig. 3. Diagrama de flujo de las etapas o experimentos.	19
Fig. 4. Método de estimación de la colonización micorrícica.	25
Fig. 5. Altura de las plantas de maíz híbrido micorrizado y un testigo bajo tres tratamientos de irrigación durante 42 días de crecimiento. Cada punto corresponde al promedio de la altura medida cada séptimo día, con una n=6, las barras son el error estándar. a) Tratamiento de 85 % de CC; b) Tratamiento de 65 % de CC; c) Tratamiento de 45 % de CC. Los inóculos se identifican como: T= testigo; IN= inóculo nativo; RI= <i>Rhizophagus intraradices</i>	31
Fig. 6. Efecto de tres niveles de irrigación sobre el desempeño vegetal del maíz híbrido con y sin micorrizas. Se muestra la media de peso seco más barras de error estándar estimados con una n=6, analizados con una prueba de LSD con 0.05%. a) peso seco en parte aérea; b) Peso seco en raíces. T= Testigo, RI= <i>Rhizophagus intraradices</i> , IN= Inóculo nativo.....	33
Fig. 7. Desarrollo observado de plantas de maíz con y sin micorrizas bajo tres niveles de irrigación. a) Plantas a los 42 días de crecimiento, se ilustran los niveles de irrigación y los tratamientos: T= testigo; IN= inóculo nativo; RI= <i>Rhizophagus intraradices</i> . b) Plantas a los 28 días de crecimiento, se muestran una planta típica de cada tratamiento a 45% de CC. c) Comparación de plantas micorrizadas y no micorrizadas a los 21 días de crecimiento. d) Comparación de plantas típicas a los 42 días de crecimiento bajo el tratamiento de 85% de CC.....	34
Fig. 8. Relación raíz/follaje (parte aérea) de bajo tres tratamientos de irrigación analizados con un Test de LSD con $p \leq 0.05$. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=6. T= testigo, IN= inóculo nativo, RI= <i>R. intraradices</i>	35
Fig. 9. Efecto de tres niveles de irrigación sobre el desarrollo de estructuras micorrícicas de <i>Rhizophagus intraradices</i> y un inóculo nativo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=6 y analizados con una prueba de LSD con 0.05%. a) Colonización total; b) Micelio externo observado; c) Vesículas; d) Arbúsculos. RI= <i>Rhizophagus intraradices</i> , IN= inóculo nativo	36

- Fig. 10. Altura de las plantas de maíz híbrido con y sin micorriza bajo cuatro tratamientos de fertilización fosfatada durante 42 días de crecimiento. En cada punto se muestra la altura el promedio medida cada séptimo día, con barras de error estándar, analizados con una prueba de LSD a partir de una n=6. a) 0 mg de P; b) 36 mg de P; c) 72 mg de P; d) 144 mg de P. T= testigo; IN= inóculo nativo; RI= *Rhizophagus intraradices*. Se muestra el promedio con error estándar de la altura medida cada séptimo día..... 38
- Fig. 11. Efecto de cuatro tratamientos fertilización mineral en la ganancia de peso seco de maíz híbrido micorrizado. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=6 y analizados con una prueba de LSD con 0.05%. a) peso seco en parte aérea; b) Peso seco en raíces. Se muestra la media de peso seco más error estándar, analizados con un test de LSD con 0.05%. 39
- Fig. 12. Relación raíz/follaje (parte aérea)de plantas de maíz micorrizadas bajo cuatro tratamientos de fertilización mineral. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=6 y analizados con un test de LSD con $p \leq 0.05\%$. T= testigo, IN= inóculo nativo, RI= *R. intraradices* 40
- Fig. 13. Desarrollo de plantas de maíz híbrido micorrizado bajo cuatro tratamientos de fertilización mineral. a) Plantas a los 42 días de crecimiento, se ilustra el inóculo nativo, *Rhizophagus intraradices* y el testigo con una planta promedio de cada tratamiento de fertilización. b) Plantas a los 28 días de crecimiento. c) Comparación de plantas inoculadas y no inoculadas a los 14 días de crecimiento. T= testigo; IN= inóculo nativo; RI= *R. intraradices*..... 41
- Fig. 14. Efecto de cuatro dosis de fertilización mineral sobre el desarrollo de estructuras micorrícicas de *Rhizophagus intraradices* y un inóculo nativo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=6 y analizados con una prueba de LSD con $p \leq 0.05\%$. IN =inóculo nativo, RI= *R. intraradices*. a) Colonización total; b) Micelio externo; c) Arbusculos; d) Vesículas..... 43
- Fig. 15. Efecto de la interacción inóculo-fertilización-irrigación en la altura de plantas de maíz híbrido con y sin micorriza. Se muestran los valores promedio y su error estándar medidos cada siete días durante 42 días de crecimiento a partir de una n=5. T= testigo, IN= inóculo nativo, RI= *R. Intraradices*. a) 85% de CC sin fertilización; b) 45% de CC sin fertilización; c) 85% de CC con macro y micro nutrientes sin fósforo; d) 45% de CC con macro y micro nutrientes sin fósforo; e) 85% de CC con macro y micro al 100%; f) 45% de CC con macro y micro nutrientes al 100% 46
- Fig. 16. Efecto de tres tratamientos de fertilización y dos niveles de irrigación sobre el desarrollo de maíz híbrido micorrizado, durante 42 días de crecimiento. a) Planta promedio con un fuerte síntoma de deficiencia de fósforo; b) Planta promedio con un mediano síntoma de deficiencia de fósforo; c) Planta promedio sin síntomas de deficiencia de fósforo a los 40 días de crecimiento; d) Desarrollo de plantas de maíz a 85% de CC; e) Desarrollo de plantas de maíz a 45% de CC. F) Planta con leve tonalidad amarilla. 48
- Fig. 17 . Contenido de prolina en ug/g de peso seco obtenidos de hojas de maíz híbrido con y sin micorriza bajo tres tratamientos de fertilización y dos de irrigación. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=5. Los datos fueron analizados con una prueba de LSD con $p \leq 0.05\%$. Los inóculos se muestran como: T= Testigo, IN= inóculo nativo, RI= *Rhizophagus intraradices* y los tratamientos de

fertilización como: +P= Fertilización al 100%, 0= sin fertilización, -P= fertilización sin fósforo.....	49
Fig. 18. Efecto de la interacción inóculo, fertilización e irrigación en el peso seco de plantas de maíz híbrido. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=5 y analizados con un test de LSD con $p \leq 0.05\%$. a) peso seco en parte aérea; b) peso seco de las raíces.	51
Fig. 19. Efecto de la fertilización e irrigación sobre la relación raíz/follaje (parte aérea) de plantas de maíz híbrido. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=5 y analizados con una prueba de LSD con $p \leq 0.05\%$. Los inóculo se muestra como: T= Testigo, IN= inóculo nativo, RI= <i>Rhizophagus intraradices</i> y los tratamientos de fertilización como: +P= Fertilización al 100%, 0= sin fertilización, -P= fertilización sin fósforo.....	52
Fig. 20. Efecto de dos niveles de irrigación y tres tratamientos de fertilización mineral en la colonización micorrícica de un inóculo nativo y <i>Rhizophagus intraradices</i> . Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=5. Los datos fueron analizados con una prueba de LSD con $p \leq 0.05\%$. a) Colonización total; b) Micelio externo; c) Arbusculos; d) Vesículas. IN= inóculo Nativo; RI= <i>Rhizophagus intraradices</i> ; 85= 85% de CC; 45=45% de CC. 0= sin fertilización; -P= Macro y micro elementos al 100% sin fósforo; +P=Macro y micro elementos al 100%.....	54
Fig. 21. Análisis de correlación entre el porcentaje de colonización total y el peso seco parte aérea. Se muestra en a) Correlación entre el peso seco de las raíces con inóculo nativo irrigadas al 85 % de CC y con fertilización sin fósforo; en b) Correlación entre el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con <i>R. intraradices</i> irrigadas al 85 % de CC y sin fertilización.....	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis edafológico del suelo utilizado	74
Anexo 2. Análisis de correlación entre el porcentaje de colonización (eje horizontal) y el peso seco del follaje y raíces de maíz híbrido (eje vertical) bajo tres tratamientos de irrigación. En cada gráfica se muestra el valor de R^2 y el valor de p de un análisis de varianza con 0.05 %. Se identifica a los inóculos como: RI= <i>Rhizophagus intraradices</i> ; IN= inóculo nativo y los tratamientos irrigación con 45=45% de CC, 65=65% de CC y 85=85 % de CC.	75
Anexo 3. Análisis de correlación entre el porcentaje de colonización total (eje horizontal) y el peso seco del follaje y raíces de maíz híbrido (eje vertical) bajo cuatro niveles de fertilización mineral. En cada gráfica se muestra el valor de R^2 y el p de un análisis de varianza con un test de LSC 0.05 estimado a partir de una $n=6$. RI= <i>Rhizophagus intraradices</i> ; IN= inóculo nativo. 0= sin fertilización, 36= 36 mg/fósforo, 72= 72 mg/fósforo, 144= 144 mg/fósforo.	76
Anexo 4. Análisis de correlación entre el porcentaje de colonización total (eje horizontal) y el peso seco del follaje y raíces de maíz híbrido (eje vertical) bajo tres tratamientos de fertilización y dos niveles de irrigación. En cada gráfica se muestra el valor de R^2 y el P de un análisis de varianza con 0.05 % estimados a partir de $n=5$. RI= <i>Rhizophagus intraradices</i> ; IN= inóculo nativo. Niveles de irrigación: 85= 85% de CC; 45= 45% de CC. Niveles de fertilización 0= sin fertilización, -P= macro y micro nutrientes sin fósforo, +P= fertilización al 100%.....	77

RESUMEN

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son microorganismos que establecen simbiosis con las raíces de las plantas y pueden aumentar la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico, sin embargo existe poca información del impacto del efecto combinado del estrés hídrico y la fertilización mineral sobre los HMA y sus hospederos. Se realizaron dos experimentos exploratorios y uno integrador para evaluar el efecto del estrés hídrico y la fertilización minera sobre el desarrollo de maíz híbrido micorrizado con *Rhizophagus intraradices* (Ri), un inóculo nativo (IN) y un testigo. Se realizó un análisis de varianza para determinar si hubo diferencias significativas entre las variables de desempeño vegetal (altura de la planta, peso seco de follaje y raíces), y la colonización micorrícica. El primer experimento evaluó el efecto de la irrigación (85, 65 y 45 % de capacidad de campo (CC)). Los pesos secos de raíces y follaje en los tratamientos micorrizados tuvieron una disminución significativa de la biomasa con respecto al testigo. Además, hubo mayor colonización micorrícica de raíces las plantas irrigadas al 45% de CC. En el segundo experimento se fertilizó con macro y micronutrientes variando únicamente la aplicación de fósforo (KH₂PO₄) (0, 36, 72, 144 mg/P total) con irrigación al 80% de CC. La biomasa seca fue similar entre el testigo y Ri mientras que IN fue el que creció menos, además, Ri colonizó por casi el doble que IN en todos los tratamientos. El experimento integrador consideró dos niveles de irrigación (85 y 45% de CC) y tres niveles de fertilización (macro y micronutrientes al 100%, macro y micronutrientes sin fósforo y sin fertilización). Nuevamente IN presentó depresión en su desarrollo vegetativo con respecto al testigo o Ri. En concordancia con los experimentos anteriores Ri tuvo mayor colonización que IN. Para confirmar la presencia de estrés hídrico en las plantas se midió el aminoácido prolina, el cual puede funcionar como osmolito y reducir la pérdida de agua de las células. Se obtuvo mayor acumulación de prolina en los tratamientos con 45 % de CC indicando la presencia de estrés hídrico. En conclusión los HMA pueden causar inhibición del crecimiento en el maíz dependiendo del inóculo utilizado, su colonización y de la humedad del suelo.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are microorganisms that form symbiosis with plant roots and may increase host plant tolerance to various types of abiotic stress. However, information on the impact of drought stress on AMF and their host plants under different fertilization regimes are missing. Two exploratory experiments and one main experiment were conducted to evaluate the effect of drought stress and mineral fertilization on the development of hybrid maize inoculated with *Rhizophagus intraradices* (Ri) or native AMF populations (NP), or left non-inoculated. The first experiment tested the effect of irrigation (85, 65 and 45% of the field capacity (FC)). The dry weight of roots and foliage in mycorrhizal treatments were lower than that of the non-mycorrhizal control. Furthermore, highest AMF root colonization was obtained in plants irrigated at 45% FC. In the second experiment plants were fertilized with macro and micronutrients varying only the dosage of phosphorus (KH₂PO₄) (0, 36, 72 and 144 mg/P) and using a constant irrigation level at 80 % FC. The dry plant biomass was similar between the non-mycorrhizal control and Ri treatments, whereas plants from the NP treatment showed the lowest plant dry biomass. Plants inoculated with Ri showed an almost double level of AMF root colonization than that of the NP treatment. The main experiment had two irrigation levels (85 and 45% of FC) and three fertilization levels (1-fully fertilized with macro and micronutrients, 2-macro and micronutrients without phosphorus and 3-without fertilization). Again the NP treatment caused plant growth depressions compared with the non-mycorrhizal control or the Ri treatment. In agreement with the previous experiments, plants from the Ri treatment had higher AMF root colonization than plants from the NP treatment. To confirm the presence of drought stress in plants was measured proline content on leaves plants, proline is an amino acid can function as osmolyte for reduce water loss from cells. Increased concentration of proline in shoot of plants grown at 45% FC confirmed drought stress at this irrigation level. In conclusion, AMF may cause growth depression in maize, depending on the type of inoculum used, level of AMF root colonization and soil humidity.

1. INTRODUCCIÓN

La revolución verde trajo consigo un incremento en la productividad de los cultivos a costa de la mecanización de las prácticas agrícolas, obtención de cultivos mejorados o híbridos altamente productivos en términos de rendimiento, control químico de las plagas y malezas, aplicación de fertilizantes sintéticos para incrementar la fertilidad del suelo e irrigación de los campos agrícolas (Gliessman, 2002).

No obstante según el VII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal del 2007 el 18 % de la superficie agrícola de México son tierras de riego, lo que implica que la obtención de maíz y otros cultivos dependen exclusivamente del agua de lluvia. Por otro lado la Comisión Nacional del Agua (2011), prevé que el acceso del agua en zonas rurales y urbanas se reduzca en los siguientes años, además considera que el cambio climático afecte la disponibilidad de agua de riego para las zonas agrícolas. Considerando que el maíz es el principal cultivo en México tanto de temporal como de riego, entonces la reducción de la disponibilidad del agua en los sistemas de producción implica un desafío para la continuidad de la producción de maíz (Mapes y Mera, 2009).

En general, la literatura menciona que la formación de micorrizas tiene un efecto benéfico en las plantas; por ejemplo, incrementan la absorción de nutrientes, confieren resistencia a sequía, entre otros. Así mismo, hacer un uso adecuado de la diversidad de microorganismos de los agroecosistemas como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) podría ser una estrategia para el desarrollo de sistemas de producción agrícola sustentables (Gianinazzi *et al.*, 2010).

Si bien la finalidad del uso de microorganismos en la agricultura se ha enfocado en el incremento de la producción y/o control de patógenos, un acercamiento desde la biología de la interacción entre elementos bióticos y abióticos podría mejorar el entendimiento y por tanto el uso de la diversidad biológica de los agroecosistemas (Gianinazzi *et al.*, 2010). Lo anterior se puede traducir en un manejo adecuado de la biodiversidad local favoreciendo las interacciones ecológicas benéficas.

Se ha documentado ampliamente el efecto de la fertilización mineral sobre el desarrollo de los HMA, así como la función que tienen las asociaciones micorrícicas para mitigar el estrés hídrico (Osonubi , 2004; Montaña, 2001; Bucher, 2006; Cho, 2006). Sin embargo, la sequía y la fertilización mineral son dos condiciones ampliamente presentes en los agroecosistemas y paradójicamente no se conoce con certeza el efecto de la interacción de ambos factores sobre la interacción de los HMA y las plantas de maíz.

Por todo lo anterior del presente proyecto de investigación fue: si la fertilización mineral y el estrés hídrico pueden afectar la interacción entre la colonización de hongos micorrícicos arbusculares y las plantas de maíz híbrido.

1.1. Hipótesis

El estrés hídrico y la fertilización mineral con fósforo incrementan la interacción de los hongos micorrícicos arbusculares y las plantas de maíz, en términos del desempeño vegetal de las plantas y la colonización micorrícica.

2. OBJETIVOS

Evaluar el efecto individual y combinado de la fertilización mineral y el estrés hídrico sobre la interacción entre colonización micorrícica y el desarrollo de maíz.

2.1. Objetivos específicos

- Identificar los efectos de la fertilización mineral y estrés hídrico sobre el desarrollo del maíz híbrido y los hongos micorrícicos arbusculares.
- Evaluar la interacción entre la colonización micorrícica y la biomasa del maíz.

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades de los hongos micorrícicos

El concepto de micorriza se ha empleado genéricamente para referirse a ciertos grupos de hongos que establecen simbiosis con las raíces de aproximadamente el 90 % de las plantas terrestres; etimológicamente la palabra se forma del griego “Mykos” (hongo) y del vocablo latino “Rhiza” (raíz) (Smith y Read, 2008).

Para la presente tesis se entiende por micorriza a la asociación generalmente mutualista que ocurre entre un hongo micorrícico (HM) y las raíces de una planta susceptible a ser colonizada. Una vez establecida la asociación, los hongos deben desarrollar estructuras funcionales dependiendo del grupo de hongos micorrícicos (hifas, arbusculos, vesículas, micelio externo, ovillos, redes de hifas), el hospedero no debe sufrir daños en sus órganos y ambos simbioses obtener beneficio mutuo.

Las asociaciones micorrícicas tienen múltiples funciones en la biología de ambos simbioses. Algunas retribuciones de las plantas hacia los HM son proveer un nicho para completar su ciclo de vida y además proporcionar carbono derivado de la fotosíntesis. Por su parte, los hongos transfieren minerales del suelo o sustrato a su hospedero, protección contra patógenos e incrementan la tolerancia a diversos tipos de estrés ambiental (Augé, 2001; Ravnskov y Jakobsen, 1995; Ruiz-Lozano 2004; Zorer *et al.*, 2010).

3.2. Tipos de asociaciones micorrícicas

Los hongos micorrícicos pueden clasificarse con base al tipo de estructuras (intra o extracelulares) que desarrollan una vez que están dentro de su hospedero, en su estrategia de vida y al grupo taxonómico que pertenecen (Cuadro 1) (Smith y Read, 2008).

La categorización más aceptada es la propuesta por Smith y Read (2008), quienes propusieron siete tipos de asociaciones micorrícicas en base al tipo de estructuras que desarrollan en las raíces de las plantas: Arbuscular, Ectomicorriza, Orquideoide, Arbutoide, Ectendomicorriza, Monotropoide y Ericoide (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características generales de los hongos micorrícicos tomada de Smith y Read (2008).

Característica	Tipo de micorriza						
	Arbuscular	Ectomicorriza	Ectendo	Arbutoide	Monotropoide	Ericoide	Orquideoide
Hongo septado	-	+	+	+	+	+	+
Hongo aseptado	+	-	-	-	-	-	-
Colonización intracelular	+	-	+	+	+	+	+
Red de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Clasificación taxonómica	Glomeromicota	Basidiomicetes/ Ascomicetes	Basidiomicetes/ Ascomicetes	Basidiomicetes	Basidiomicetes	Ascomicetes	Basidiomicetes
Taxa que coloniza	Bryophyta, Pteridophyta Gymnospermae Angiospermae.	Gymnospermae Angiospermae	Gymnospermae Angiospermae	Ericales	Monotropoideae	Ericales Bryophyta	Orchidales

De los siete grupos de HM, tres son los más estudiados y con mayor presencia en la naturaleza. Las Ectomicorrizas forman una red de hifas llamada Red de Hartig entre los espacios intercelulares de las primeras capas de células del córtex pero dicha red no penetra dentro de las células (Smith y Read 2008). Otro tipo muy específico de HM son los orquideoides, los cuales establecen simbiosis únicamente con las raíces de orquídeas terrestres y epífitas, y forman una red de hifas dentro de las células del córtex denominada pelotón u oவில் (Dearnaley, 2007). Los hongos micorrícicos arbusculares son el grupo de HM con mayor distribución, se encuentran en la mayoría de los ecosistemas y establecen simbiosis con cerca del 80 % de las plantas vasculares colonizando un gran número de especies de gimnospermas, angiospermas y pteridofitas (Brundrett, 2002; Smith y Read 2008).

2.2.1. Hongos micorrícicos arbusculares

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) pertenecen al phylum Glomeromycota, el cual cuenta con tres clases (Archaeosporomycetes, Glomeromycetes, and Paraglomeromycetes), cinco órdenes (Archaeosporales, Diversisporales, Gigasporales, Glomerales y Paraglomerales), 14 familias, 29 géneros de los cuales *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Scutellospora* son los más estudiados (Oehl *et al.*, 2011). El número de especies puede variar dependiendo del sistemas de

clasificación y las herramientas metodológicas empleadas, básicamente existen dos escuelas taxonómicas. Los que se basan en herramientas de biología molecular en función de ADN y los que utilizan aspectos morfológicos de las esporas, micelio y arbusculos, aunque el mayor énfasis está en las características de la spora (Morton y Benny, 1990).

Los HMA forman arbusculos dentro de las células del córtex de las plantas (Smith y Read, 2008). Los arbusculos son extensiones de hifas que se forman a partir de ramificaciones sobre la pared celular y se encargan del intercambio de nutrientes entre ambos simbioses y por lo general son estructuras que una vez desarrolladas solo se mantienen activas por corto tiempo (Johnson, 2010).

El ciclo de vida de los HMA puede dividirse en dos etapas, la primera es una fase asimbiótica y se inicia con la germinación de propágulos (hifas en suelo o raíces muertas) o esporas. Una vez que los propágulos están en contacto con las raíces de las plantas forman el apresorio, que es una acumulación de hifas en la epidermis de las raíces que permite el paso de las hifas al córtex sin provocar la muerte de las células. La activación de propágulos así como el establecimiento de la simbiosis puede estar mediado por elementos ambientales y exudados de las raíces (Fig. 1) (Requena *et al.*, 2007).

La segunda fase o fase simbiótica se lleva dentro de las raíces y en ésta se desarrollan sus estructuras micorrícicas: hifas, arbusculos y vesículas. En esta fase se establece el intercambio activo de nutrientes minerales del hongo a la planta y de fotosintatos de la planta al hongo, además hay un amplio desarrollo de hifas en la rizósfera. Al final del ciclo de vida se vuelven a formar nuevos propágulos y esporas de resistencia (Fig. 1) (Requena *et al.*, 2007).

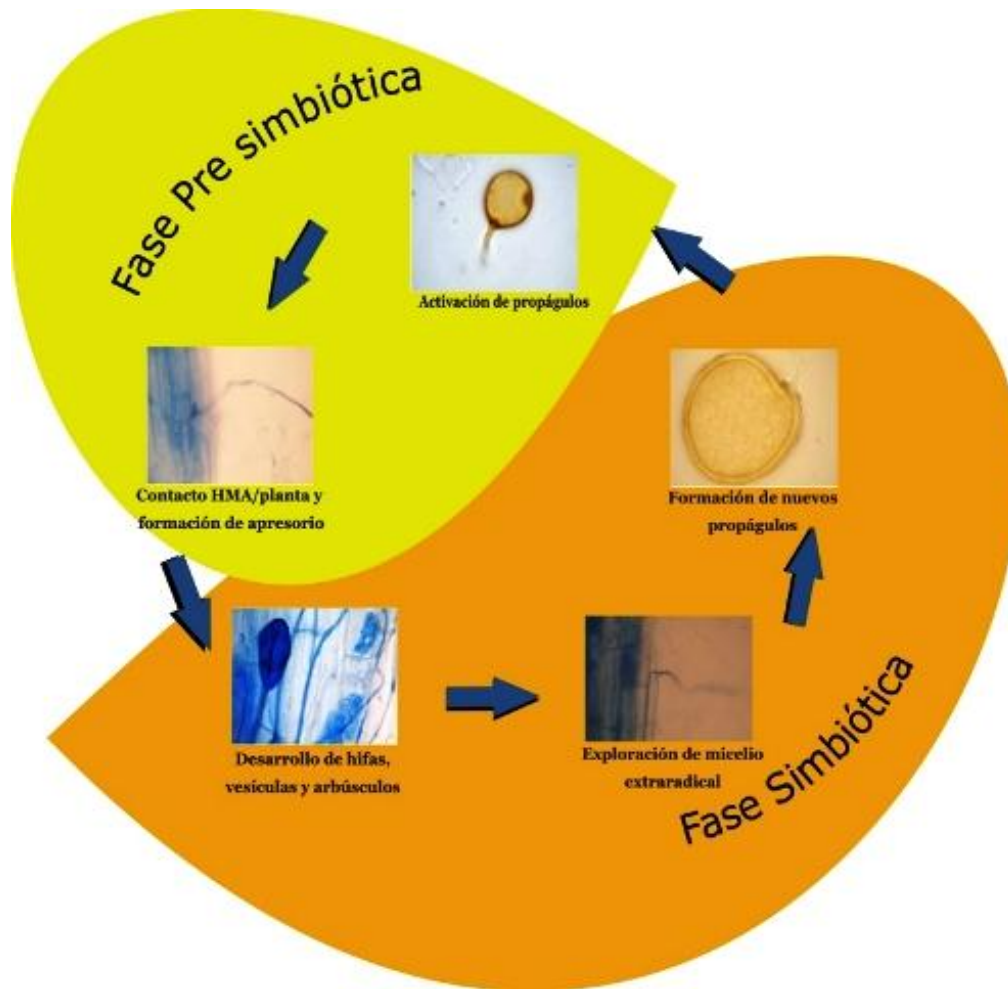


Fig. 1. Ciclo de vida de los Hongos micorrícicos arbusculares, modificado de Requena *et al.*, 2007.

Los HMA no tienen fase sexual, pero son capaces de formar esporas de resistencia multinucleadas, además algunas extensiones de hifas dentro y fuera de las raíces potencialmente pueden fungir como propágulos. Es importante mencionar que las esporas y propágulos de hifas multinucleadas hacen complicado distinguir el concepto de individuo y clon dentro de una comunidad de HMA (Rosendahl, 2008).

Se han encontrado restos fósiles de HMA con más de 460 millones de años, lo cual se propone que éste tipo de microorganismos tuvieron fuerte influencia en la colonización de las plantas acuáticas en medios terrestres (Smith y Read, 2008).

2.3. Relaciones entre los HMA y las plantas

Entre los efectos benéficos de los HMA en las plantas esta: la promoción de crecimiento, protección a las raíces contra patógenos, incrementan la absorción de minerales principalmente de fósforo a través de la solubilización de los compuestos del suelo y mejoran algunas de las características físicas y químicas del suelo (Wall *et al.*, 2012).

2.3.1. El papel de los HMA en la reducción del estrés en maíz

El estrés se puede definir como los factores bióticos y abióticos que influyen negativamente en las plantas. El estrés puede medirse en función de la supervivencia de las plantas, la acumulación de biomasa y procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006).

Los HMA pueden incrementar la tolerancia de las plantas de maíz sometidas a altas temperaturas (Xian-Can *et al.*, 2011), en la producción de biomasa en diferentes regímenes de riego (Zorer *et al.*, 2010), incrementar la capacidad de absorción de minerales en suelos compactados (Miransari *et al.*, 2009) y en diversos trabajos disminuyen estrés hídrico (Ruiz-Lozano, 2003; Ruiz-Lozano, 2004). Las asociaciones micorrícicas tienen diversos efectos sobre las plantas para resistir el estrés hídrico. Algunos efectos en las plantas son la regulación de la tasa de transpiración, mejoran la conductividad eléctrica de las raíces, mayor absorción de agua por medio del micelio externo, mejoran el potencial hídrico de los tejidos, incrementan la actividad fotosintética y mejoran la estructura de los suelos (Auge, 2001; Auge, 2003; Rillig y Mummey, 2006; Robert *et al.*, 2008).

Específicamente la actividad fotosintética de plantas de maíz inoculadas con HMA mejoraron la concentración de clorofila *a* y *b*, lo que incrementa la tasa fotosintética neta y por ende una mayor acumulación de biomasa durante periodos de estrés hídrico. Además el aumento de los azúcares solubles podrían ser transferidos a las raíces y suministrados a los HMA con el fin de extender la exploración del micelio externo en búsqueda de agua (Boomsma y Vyn, 2008).

Las plantas micorrizadas de maíz sometidas a estrés hídrico durante cinco días inoculadas con *Glomus intraradices* y *G. mosseae* tuvieron una mayor tasa de asimilación de CO₂, menores valores del potencial hídrico y de recuperación de los tratamientos con respecto a las plantas testigo sin micorriza (Amerian *et al.*, 2001). De igual modo Sheng *et al.*, (2008) encontraron una mayor acumulación de electrolitos y azúcares totales en las raíces y tallos en plantas de maíz micorrizadas con *G. mosseae* bajo condiciones de estrés salino, por lo que los autores concluyeron que la simbiosis mejoró la capacidad osmoreguratora.

2.3.2. Contribución de los HMA en la nutrición de las plantas

Se ha comprobado que las asociaciones micorrícicas pueden incrementar la absorción de nutrientes esenciales del suelo y hacerlos potencialmente disponibles para realizar funciones metabólicas de la planta (Bolan, 1991). Los principales nutrientes que pueden ser absorbidos por las hifas micorrícicas son Fósforo (P), Nitrógeno (N), Potasio (K), Azufre (S), Manganeseo (Mn), Zinc (Zn), Hierro (Fe), Boro (B), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Sodio (Na), Aluminio (Al) y Silicio (Si) (Clark y Zeto, 2000).

El incremento en la absorción de minerales del suelo de las plantas micorrizadas se debe a que el micelio externo de los HMA puede explorar un mayor volumen del suelo y trasportar a las plantas minerales a través de enzimas como la fosfatasa y reductasa alcalina y algunas ATP-etas. Además es probable que los minerales del suelo tengan mayor afinidad con los transportadores de las hifas que con los de las raíces de las plantas (Gianinazzi-Pearson 1979; Bolan, 1991; Bucher, 2006).

Ahora bien, es importante mencionar que el principal nutriente que absorbe los HMA es el fósforo, incluso para algunas especies vegetales éste tipo de adquisición de nutrientes representa hasta el 100%. La absorción de fósforo se incrementa incluso cuando dicho mineral no es limitante en la solución del suelo (Smith *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2000).

Se ha encontrado que la aplicación de fertilizantes orgánicos o de síntesis química pueden reducir significativamente la cantidad de propágulos (hifas o esporas) y la diversidad de morfotipos en el suelo, así como la colonización de las raíces de las plantas (Simard *et al.*, 2004).

2.3.3. *Los HMA en la salud de las plantas.*

Las asociaciones micorrícicas tienen cuatro mecanismos de control biológico de patógenos: a) cambios en las concentraciones de nutrientes en la rizósfera; b) inducción de resistencia a través de cambios bioquímicos en las raíces de plantas; c) cambios en la morfología de las raíces, d) competencia entre los HMA y los patógenos por espacio y nutrientes (Whipps, 2004). No obstante, el efecto final del uso de HMA como controladores biológicos de enfermedades depende en gran medida de las condiciones ambientales donde se desarrolla la planta hospedera, del patógeno y su nivel de virulencia en relación a la cepa u hongos micorrícicos que se utilicen (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Whipps, 2001; Whipps, 2004).

Experimentos con diferentes cultivos como calabaza, jitomate, chile y frutales para el control de patógenos de los géneros *Fusarium*, *Pythium*, *Clonostachys*, *Phytophthora* han reportado efectos benéficos en el control o supresión de la incidencia de enfermedades, sin embargo no se detallan los mecanismos biológicos de control (Larsen *et al.*, 2003; Larsen *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2007; Alabouvette *et al.*, 2009).

2.4. Comunidades de HMA en los agroecosistemas

Los propágulos de los HMA son esporas viables e hifas en el suelo y en raíces vivas o muertas; no obstante, la infectividad de éstos depende de su viabilidad y del éxito en encontrar un hospedero funcionalmente compatible. La eficiencia de infección depende del uso del suelo, el clima y la densidad y riqueza de especies vegetales. En el caso específico de los HMA de los géneros *Acaulospora* y *Glomus* es recomendable usar inóculo de esporas, hifas y raíces colonizadas (Klironomos y Hart 2002).

En una parcela de maíz asociado con frijol nescafé (*Mucuna deeringiana* Merr.) como cultivo de cobertura, se encontraron 23 morfotipos de HMA siendo *Glomus* y *Acaulospora* los géneros dominantes, en contraste, *Entrophospora*, *Gigaspora* e *Intraspora* fueron los menos presentes. La cantidad de esporas/gramo de suelo fue variable aunque la diversidad

de especies de HMA y su colonización se favoreció con la presencia del cultivo de cobertura (Pérez-Luna *et al.*, 2012).

Una de las áreas que no se han investigado a profundidad es el manejo y uso de los HMA nativos del suelo, es decir, las comunidades de hongos presentes en los agroecosistemas. Éstos pueden ser una alternativa para promover una agricultura más sustentable. Por otro lado, tampoco se conocen los efectos de las comunidades nativas de hongos sobre los cultivos agrícolas tanto en sistemas de producción intensivos como tradicionales (Montaño *et al.*, 2012).

En un agroecosistema, los HMA nativos están adaptados a su medio, lo que les confiere, una mayor capacidad de tolerancia de las condiciones ambientales locales con respecto a los HMA inoculados o alóctonos. Por su parte, los HMA alóctonos podrían requerir un proceso de adaptación en el cual su desarrollo y funciones vitales se reduzcan (Klironomos, 2003).

Algunas prácticas de manejo de los suelos agrícolas como la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes minerales, plaguicidas y prácticas de labranza intensiva pueden afectar las comunidades de microorganismos del suelo entre ellos los HMA nativos (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

2.5. Estrés hídrico en plantas

El agua y la luz son los dos componentes del ambiente esenciales para las reacciones metabólicas de la fotosíntesis. Dichos elementos son la fuente esencial en la cadena de transporte de electrones (reacciones luminosas de la fotosíntesis) y por tanto la deficiencia en alguno de ellos tiene un impacto directo en la acumulación de biomasa (Ghannoum, 2009). El estrés hídrico puede también reducir en la eficiencia y número de los centros de reacción (PSI y PSII) de la fase luminosa por medio de la fotoinhibición y fotooxidación (Leszeks, 2003; Doubnerová y Ryslavá, 2011)

El estrés hídrico se puede definir como el contenido de agua en los tejidos o células que está por debajo del nivel máximo de hidratación. Cuando el estrés hídrico se presenta gradualmente, la planta tiene la capacidad de generar cambios fisiológicos y anatómicos

con el fin de hacer frente a las condiciones de estrés (Taíz y Zeiger, 2006). El estrés hídrico es un estado fisiológico de las plantas en que algunos genes se expresan para sintetizar compuestos orgánicos como fitohormonas, osmolitos y antioxidantes, los cuales pueden o no sintetizarse de *novo* y en general, tiene como objetivo prevenir la pérdida de agua en las células (Taiz y Zeiger, 2006; Ghannoum, 2009)

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que controla muchos aspectos importantes del desarrollo y fisiología de la planta bajo condiciones de estrés, incluyendo la síntesis de proteínas y lípidos de resistencia en las semillas, adquisición de la tolerancia de semillas a la desecación, cierre de estomas, incremento del crecimiento del sistema radical y reducción de la parte aérea como respuesta ante estrés hídrico y salino (osmótico) (Taiz, 2006). Se ha reportado un incremento hasta de 50 veces de la concentración de ABA en los tejidos de la plantas sometidas a sequía y éste es un factor importante en cierre de estomas para reducir la transpiración. Las células oclusivas estomáticas parecen percibir incrementos del ABA en la superficie exterior de la membrana plasmática ocasionando que se la apertura de canales de Ca^{+2} y la despolarización temporal de la membrana lo cual promueve la apertura de canales de Cl^{-} e inhibición de canales de entrada de K^{+} , también se inhiben las bombas de protones-ATPasas y la pérdida de iones ocasiona disminución de la turgencia de las células guarda y por ende cierre de los estomas (Fan *et al.* 2004).

Los osmolitos son moléculas orgánicas e inorgánicas que pueden de retener el agua en las células o tejidos vegetales bajo condiciones de estrés osmótico, de tal modo que se reduce la pérdida de agua por transpiración o por diferencias de potenciales hídricos con el suelo. Algunos ejemplos de osmolitos en las plantas son iones de potasio, carbohidratos como la sacarosa o la trehalosa, polialcoholes como el glicerol o el sorbitol o aminoácidos y aminoácidos como la prolina (Leszeks, 2003). En general, la función de los osmolitos es proteger a las plantas pérdida de agua celular actuando como reguladores de la presión osmótica y evitando así la plasmólisis, lo que permite en su conjunto mantener un adecuado potencial hídrico entre las plantas y el suelo (Leszeks, 2003).

2.5.1. La Prolina como regulador osmótico ante el estrés hídrico

La prolina es un aminoácido que se encuentra en tallos, hojas y raíces y puede actuar como osmolito, es decir como una sustancia que puede regular los contenidos hídricos en la célula con el fin de reducir alteraciones funcionales en estrés hídrico, salinidad, temperaturas extremas, radiación UV y metales pesados (Ashraf y Foolad, 2007).

La prolina además de evitar la deshidratación de las células mediante el ajuste osmótico, también preserva las proteínas de las membranas y reduce el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el citosol (Lehmann *et al.*, 2010).

La cebolla (*Allium cepa*), soya (*Glycine max*), cebada (*Hordeum vulgare*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) son algunos ejemplos en los que se han encontrado que la aplicación de prolina exógena puede reducir el estrés hídrico, además de proteger algunas funciones metabólicas y estructurales de las plantas (Ashraf y Foolad, 2007).

Específicamente en maíz en condiciones de estrés hídrico se ha encontrado mayor acumulación de prolina en tejidos verdes de plántulas de diferentes variedades (Ibarra-Caballero *et al.*, 1987). Además la concentración de dicho osmolito puede representar hasta el 50% del ajuste osmótico en raíces de dicha gramínea (Voetberg y Sharp, 1991). Ilahi y Dörffling (1982) concluyeron que los niveles de prolina de diversos genotipos de maíz se correlacionan inversamente con su capacidad para resistir el estrés hídrico severo.

2.6. El maíz

El maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia Poaceae y comprende cuatro subespecies que agrupan 56 razas mexicanas (Mera, 2009). El maíz es una planta de crecimiento anual. Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo y se encuentran abrazadas al tallo mediante la vaina que envuelve el entrenudo de tamaño y ancho variable. Las raíces primarias son fibrosas presentando además raíces adventicias más finas, que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo y sirven de anclaje a la planta (Jugenheimer, 1988).

El maíz es una planta monoica y en el fruto (comúnmente mazorca) crecen los granos o semillas los cuales se desarrollan a partir de la fecundación individual de cada uno de ellos,

además sus estructuras (pericarpio, endospermo y embrión) le confieren propiedades físicas y químicas (color, textura, tamaño, número) que distinguen las razas, variedades e híbridos (Ortega-Paczka, 2003).

El cultivo del maíz se ha desarrollado y adaptado a las condiciones particulares de cada región, así es posible encontrar sistemas de producción altamente tecnificados adicionados con riego e insumos agrícolas como fertilizantes, plaguicidas, riego y mecanización del suelo. En contraste, los sistemas tradicionales como la milpa en roza-tumba-quema, se tala la vegetación natural para el establecimiento del cultivo; éste sitio se cultiva por dos a cinco años y posteriormente se abandona para permitir la regeneración natural retornando a al mismo sitio en 10 o 15 años (Mapes y Mera, 2009).

Se reconocen 59 razas mexicanas de maíz que se agrupan en cuatro grupos de acuerdo a la similitud de sus características morfológicas e isoenzimáticas (Sánchez *et al.*, 2000). Además, existe fuerte evidencia que las razas actuales se han desarrollado íntimamente con elementos antropocéntricos, es decir con culturas indígenas y elementos de adaptación al medio (Ortega-Paczka, 2003).

2.7. Las micorrizas y diferentes cultivos

Se han documentado que los hongos micorrícicos arbusculares pueden mejorar el desempeño vegetal bajo condiciones de sequía y con baja disponibilidad de nutrientes. En el cuadro 2 se resumen algunos efectos benéficos que tienen los HMA sobre algunas especies de interés agrícola.

Cuadro 2. Efecto en plantas de diferentes hongos micorrícicos arbusculares (HMA) sobre diferentes especies de interés agrícola.

Factor	Planta	HMA	Conclusión	Referencia
Estrés hídrico	Soya	<i>Glomus intraradices</i>	Mejora la biomasa de brotes, mejora el potencial hídrico de las hojas, hay mayor acumulación de prolina en raíces que en hojas	Ruiz-Lozano, 2004
	Maíz	<i>Glomus intraradices</i>	Tolerancia moderada al estrés hídrico, ajustes en el potencial hídrico de la hoja, mantiene la coloración verde en las hojas bajo estrés hídrico	Subramanian <i>et al.</i> , 1995
	Varios	Consorcio	Mejoraron la concentración de clorofila a y b lo que incrementa la tasa fotosintética neta y por ende hay mayor acumulación de biomasa	Boomsma y Vyn, 2008
	Maíz	<i>Glomus intraradices</i> , <i>Glomus mosseae</i>	Mayor tasa de asimilación de CO ₂ , mayores valores del potencial hídrico y de recuperación de las plantas	Amerian <i>et al.</i> , 2001
	Maíz	<i>Glomus mosseae</i> <i>Glomus intraradices</i> , <i>Gigaspora margarita</i>	Incrementa el contenido de clorofila y la asimilación de CO ₂ Incrementa la conductancia estomática y el potencial osmótico	Sheng <i>et al.</i> , 2008 Cho <i>et al.</i> , 2006
Fertilización	Maíz y Trigo	Nativos	La colonización depende de la fertilización y la eficiencia del uso de fósforo y nitrógeno	Montaño <i>et al.</i> , 2001
	Maíz y Sorgo	Nativos	Incremento de absorción de fósforo	Osonubi, 1994
	Maíz	<i>Glomus versiforme</i>	Incremento de absorción de fósforo y modificación de raíces	Braunberger <i>et al.</i> , 1991
	---	Nativos	Incrementa micelio con fertilización orgánica, pero hay un decremento con aplicación de fósforo	Gryndler <i>et al.</i> , 2006
	Papaya	<i>Glomus sp.</i>	Incremento de absorción de fósforo, en suelo estéril	Quiñones-Aguilar <i>et al.</i> , 2012

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales biológicos

Se utilizó la variedad de maíz híbrido NB 9 de la empresa NOVASEM que es recomendada para la producción de maíz para grano en el Bajío. Comercialmente la variedad utilizada se siembra para producción de maíz blanco y tiene una altura promedio de 2.7 metros; un tiempo aproximado de 80 y 185 días para la floración y cosecha respectivamente. Éste genotipo fue desarrollado para tolerar la sequía.

En los tres experimentos se utilizaron dos inóculos de HMA: 1) la cepa BEG87 de *Rhizophagus intraradices*, antes llamado *Glomus intraradices*, del Laboratorio de Agroecología del Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM; 2) Un inóculo de hongos micorrícicos nativos obtenido a partir de la mezcla de suelo rizosférico de 10 plantas de maíz cultivado en el campo experimental del Centro Regional Universitario del Occidente, de la Universidad Autónoma de Chapingo. Del inóculo nativo se determinó un contenido de 3.36 esporas/g de suelo turgentes, en otras palabras, no se cuantificaron las esporas con paredes celulares rotas o que no estuvieran turgentes. Los inóculos se seleccionaron siguiendo dos criterios: 1) Uno de los objetivos de investigación del Laboratorio de Agroecología es la promoción los microorganismos nativos del suelo para la mejoramiento y establecimiento se sistemas agrícolas sustentables. En ese sentido la selección de la cepa de *R. intraradices* y el inóculo nativo fue generar conocimiento del impacto de dos de los elementos más frecuentemente encontrados en los agroecosistemas (la fertilización y la falta de irrigación) sobre el porcentaje de colonización de las poblaciones de hongos micorrícicos nativos en maíz. Por otra parte, el uso de la especie *R. intraradices* es la más frecuentemente usada como insumo agrícola para incrementar la producción de cultivos agrícolas, por esa razón la cepa utilizada de *R. intraradices* responde por un lado a ser un testigo del las poblaciones nativas de HMA bajo estrés hídrico y fertilización mineral y finalmente porque es una forma muy indirecta de validar el uso o no de inóculos de HMA en los sistemas agrícolas.

3.1.1. Determinación de morfotipos del inóculo nativo

Para cuantificar los morfotipos de los hongos micorrícicos presentes en el inóculo nativo se realizó la extracción e identificación de morfotipos de tres muestras aleatorias de suelo y las muestras se identificaron a nivel de género mediante el sistema de clasificación morfológico descrito por Oehl et al., (2011) (Fig. 2-B).

Para la extracción de esporas se modificó la técnica descrita en el manual de Trejo (2008), la cual consistió en pesar 50 g de suelo e hidratarlo por 30 minutos en un litro de agua, posteriormente se agregaron dos cucharadas soperas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se homogenizó y dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente se mezcló en licuadora por 20 segundos e inmediatamente y se tamizó por diferentes tamaños hasta llegar al de 35 micras, el suelo obtenido del tamizado (35 micras) nuevamente se colocó en un tubo falcón aforado a 10 mL y se centrifugó a 1000 revoluciones por dos minutos. La fase acuosa se eliminó y al asiento se le añadió agua con azúcar al 50 % hasta aforar a 10 mL y con un vortex se hizo una mezcla homogénea. Finalmente se volvió a centrifugar del modo descrito anteriormente y el sobrenadante se recuperó con el tamiz de 35 micras y lo obtenido fue almacenado en tubos falcón con agua destilada para la identificación de morfotipos (Fig. 2-A).

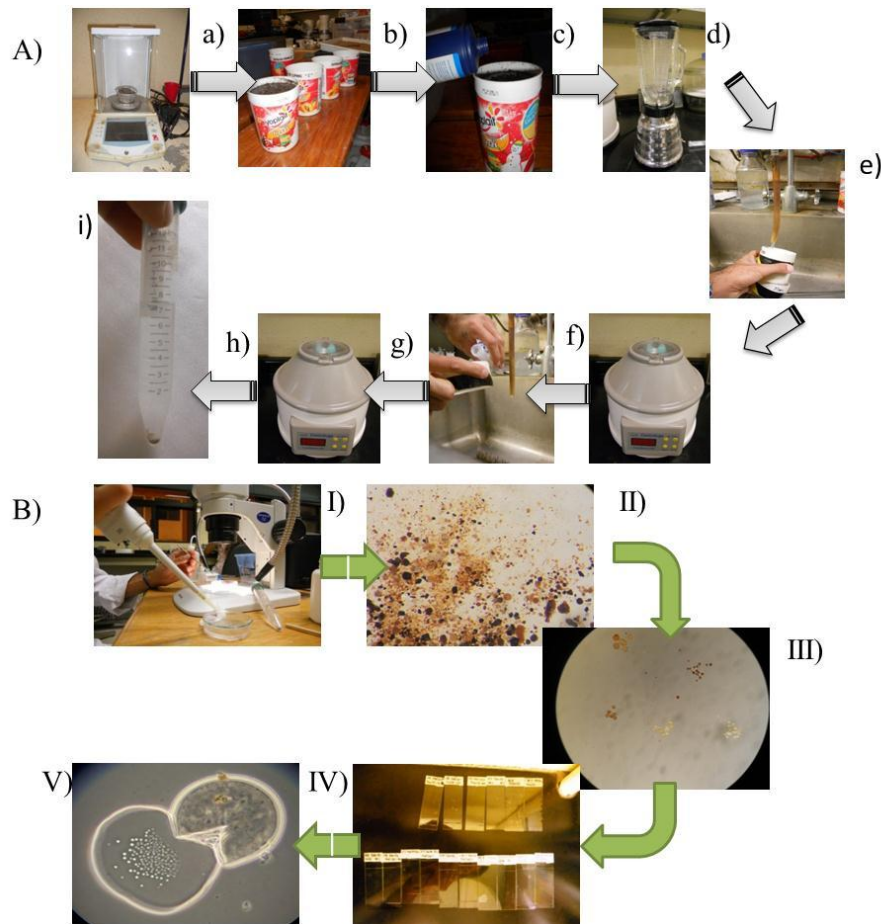


Fig. 2. Proceso de extracción e identificación de morfotipos del inóculo nativo. En la sección “A” se ilustra el proceso de extracción de esporas (a) peso de suelo; (b) hidratación del suelo; (c) aplicación de peróxido de hidrógeno; (d) mezclado del suelo en licuadora; (e) tamizado del suelo hasta obtener el de 35 micras; (f) centrifugación de los tamizados a 1000 rpm; (g) colocación de azúcar al 50% y tamizado del sobrenadante; (i) obtención del extracto de esporas. En la sección “B” I) Colocación y separación del extracto; II) Extracción de esporas turgentes del resto de esporas; III) clasificación de esporas por morfa, color y tamaño semejantes; IV) Montaje de esporas en PLVG y PLVG+ solución Melzer; V) Espora aislada.

Los sobrenadantes obtenidos en la extracción de esporas se colocaron en una caja Petri de 60x15 mm y en el microscopio estereoscópico se separaron las sales, partículas de suelo y materia orgánica de las esporas utilizando una aguja de disección. Una vez que se obtuvieron las esporas turgentes y sin rupturas de la pared celular se colocaron en un vidrio de reloj con el apoyo de una pipeta de 20 μ L. El total de esporas separadas del extracto se clasificaron por color, forma y tamaño y éstas se montaron en portaobjetos con alcohol polivinílico en lactoglicerina (PVLG) y en PLVG+solución Melzer para identificar el número de morfotipos en microscopio (Trejo *et al.*, 2008).

3.2. Elaboración y manejo del sustrato

El sustrato se elaboró en base a una mezcla de suelo y arena de río en proporciones 1:1 con base en pesos secos. Para lo anterior ambos materiales se colocaron al sol directo hasta que se obtuvieron materiales secos al tacto. Una vez utilizado el suelo fue devuelto a la parcela.

El suelo se colectó mediante una muestra compuesta de la misma parcela donde se obtuvo el inóculo nativo. El suelo según la carta edafológica 1:50,000 de INEGI lo clasifica como como una clase de suelo vertisol y el análisis de suelo realizado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, campo experimental Bajío, menciona que es un suelo arcilloso con una capacidad de campo del 37.5%, con pH neutro (7.28), bajo contenido de fósforo pero alto en materia orgánica y nitrógeno (Anexo 1).

El sustrato fue esterilizado en autoclave a 1.5 Kg/cm² de presión y a una temperatura de 120° C por una hora. Para asegurar la eliminación de los microorganismos del suelo el proceso anterior se realizó por dos ocasiones dejando al menos 2 días entre la primera y la segunda esterilización.

3.2.1. Estimación de la capacidad de campo del suelo

Se estimó la capacidad de campo del sustrato por el método gravimétrico, el cual consistió en pesar cinco muestras de 1000 y 50 g de sustrato saturado de agua, posteriormente fueron secadas en un horno de convección por 48 horas a 105°C (Llorca, 2006). El porcentaje de humedad del suelo se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de capacidad de campo (CC)} = \frac{(\text{Peso de suelo húmedo} - \text{Peso de suelo seco}) \times 100}{\text{Peso de suelo seco}}$$

3.3. Diseño experimental

Para la etapa experimental se realizaron dos experimentos exploratorios en los que se analizaron los efectos de la fertilización mineral e irrigación en el desarrollo de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y sus hospederos, con el fin de seleccionar tratamientos contrastantes. Se diseñó un tercer experimento en el que se integran todos los factores de estudio (HMA, fertilización e irrigación) sobre el maíz (Fig. 3). Los diseños experimentales de cada etapa se muestran en el Cuadro 3.

En todas las etapas se evaluó el desempeño vegetal (peso de materia seca y húmeda en parte aérea y raíces) y la colonización micorrícica. Solo para confirmar el estrés hídrico en las plantas se estimó el contenido de prolina en la hoja bandera en el etapa 3.

Es importante mencionar que en todos los experimentos el inóculo y la cepa fue del 10% del sustrato total, es decir 80 g de inóculo o cepa y 720 g de sustrato, por lo que, solo en el caso de los tratamientos testigo el sustrato fue de 800 g.



Fig. 3. Diagrama de flujo de las etapas o experimentos.

Cuadro 3. Diseños experimentales de las tres etapas de evaluación

Etapas	Factores			Unidades experimentales
	HMA	Fertilización	Irrigación (CC)	
1er experimento		Sin fertilización	45, 65 y 85 %	3HMA x 3 irrigaciones x 6 repeticiones= <u>54UE</u>
2do experimento	Testigo Nativo <i>R. intraradices</i>	0, 36, 72, 144 mg/P total, más macro y micro nutrientes al 100% • Macro y micro elementos al 100% <i>sin</i> fósforo • Macro y micro elementos al 100% <i>con</i> fósforo • Testigo sin fertilización	80 %	3HMA x 4fertilizaciones x 6 repeticiones= <u>72 UE</u>
3er experimento			45 y 85 %	3HMA x 2 irrigaciones x 3 fertilizaciones x 5 repeticiones= <u>90 UE</u>

UE= unidades experimentales

3.3.1. Efecto de la irrigación sobre el desarrollo de HMA en maíz

La primera etapa tuvo como objetivo identificar niveles de irrigación contrastante que afectan el desarrollo de los HMA y el maíz. Éste experimento se diseñó con dos factores (HMA e Irrigación). Las plantas crecieron por tres semanas a 80 % de Capacidad de Campo (CC) para permitir la micorrización y posteriormente tres semanas más con los tratamientos de irrigación (45, 65 y 85% de CC). No fue considerado el tiempo de recuperación de las plantas, por lo que al concluir la sexta semana se cosecharon y procesaron todas las unidades experimentales (Cuadro 3).

3.3.2. Efecto de la fertilización mineral en el desarrollo de HMA en maíz

En esta fase se exploró el efecto de la aplicación de fósforo en la respuesta de los HMA (Testigo, Nativo y *Rhizophagus*) en plantas de maíz bajo irrigación constante. Las unidades experimentales se mantuvieron a 80 % de CC durante las seis semanas aplicando los tratamientos semanalmente.

La fórmula de fertilización mineral fue desarrollada por la University of Western Australia, la cual considera macronutrientes y micronutrientes (Cuadro 4). Los micronutrientes y la fuente de potasio solo se aplicaron una vez durante el establecimiento del experimento, mientras que el nitrato y sulfato se aplicaron semanalmente. Por lo tanto, el experimento se diseñó variando solo la aplicación de fósforo (0, 7.5, 15 y 30 mg/P por kg de sustrato/semana) y el resto de nutrientes se aplicaron al 100% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Macro y micro nutrientes utilizados en los tratamientos de fertilización.

No.	Nutriente	Fórmula	Concentración		Aplicación	
			g/L	mg/Kg de sustrato	mL de solución/kg sustrato	mL/800 g de sustrato (Unidad Experimental)
1	Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	25	75	3	2.4
2	Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	28.57 (10 mg N/ mL)	86.2	3	2.4
3	Cloruro de calcio	CaCl ₂	25	30 de N	3	2.4
4	Fosfato de	KH ₂ PO ₄	43.93	0, 7.5, 15	0, 0.75, 1.5 y 3	0, 0.6, 1.2, 2.4

No.	Nutriente	Fórmula	Concentración		Aplicación	
			(10 mg P/ mL)	y 30 de P		
	potasio					
5	Sulfato de cobre	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.7	2.1	3	2.4
6	Sulfato de zinc	ZnSO ₄ 7H ₂ O	1.8	5.4	3	2.4
7	Sulfato de manganeso	MnSO ₄ H ₂ O	3.5	10.5	3	2.4
8	Sulfato de cobalto	CoSO ₄ 7H ₂ O	0.13	0.39	3	2.4
9	Sulfato de magnesio	MgSO ₄ 7H ₂ O	15	45	3	2.4
10	Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₂ 7H ₂ O	0.06	0.18	3	2.4

3.3.3. Evaluación de la interacción entre estrés hídrico y fertilización mineral en el desarrollo de HMA y maíz híbrido.

Este fue un experimento integral de los experimentos anteriores, el objetivo fue analizar el efecto conjunto de la fertilización y el estrés hídrico en el desarrollo de las plantas de maíz y sus micorrizas.

Se seleccionaron dos niveles de irrigación contrastantes (45 y 85 % de CC), tres niveles de fertilización mineral (macro y micro elementos al 100%, macro y micro elementos al 100% sin fósforo, testigo sin fertilización) y los tres tratamientos de hongos (Testigo, Nativo *Rhizophagus*) (Cuadro 3).

Es importante mencionar que solo para ésta etapa se realizó una prueba del contenido de prolina para tener un indicador indirecto y cuantitativo del estrés hídrico en las plantas. Además en base a los resultados obtenidos de la etapa 2 se optó por tener un testigo absoluto, es decir un tratamiento que no tuviera ninguna fertilización dado que los resultados no mostraron un contraste estadísticamente significativo entre los tratamientos fertilizados.

Los tratamientos se aplicaron del mismo modo que en los experimentos exploratorios, las tres primeras semanas de crecimiento del maíz se mantuvieron a 80% de CC y posteriormente tres semanas bajo los tratamientos de irrigación. En el caso de la fertilización los micronutrientes y potasio se aplicaron durante el establecimiento del experimento y el nitrógeno y los tratamientos de fertilización cada semana durante todo desarrollo del experimento.

3.4. Condiciones de crecimiento de las plantas

Todos los experimentos se establecieron en el invernadero por un periodo de crecimiento de 6 semanas. Un día previo a la siembra se regó el sustrato con 200 mL de agua en cada unidad experimental (maceta). Solo los tratamientos de cada inóculo (irrigación y fertilización) se colocaron al azar, pero nunca se mezclaron las plantas entre inóculos (nativo, testigo y *Rhizophagus*), lo anterior para reducir el riesgo de contaminación.

Se colocaron tres semillas para asegurar la germinación de al menos una planta por unidad experimental y posteriormente a la semana de siembra se removieron las plantas excedentes dejando solo una planta por maceta. El criterio para la eliminación de plántulas fue tener plantas del mismo tamaño para reducir el sesgo entre tratamientos.

La cosecha consistió en eliminar el sustrato de las raíces de las plantas sacudiendo y enjuagando con abundante agua corriente, en éste proceso se cortó la parte aérea y las raíces y se colocaron en bolsas de papel y plástico respectivamente.

3.5. Variables

3.5.1. Evaluación del desempeño vegetal

Cada semana durante el desarrollo del experimento se midieron las alturas de las plantas siendo la primera medida al séptimo día y la última el día de la cosecha (42 días de crecimiento).

También se estimó el peso seco de la parte aérea y radicular por separado. Las muestras fueron secadas en un horno a 80°C por 48 horas. Como fue necesario ocupar un porcentaje de las raíces frescas para la cuantificación de colonización micorrícica se estandarizó la estimación del peso seco de las raíces colocando una submuestra de aproximadamente 3 gramos en la estufa y posteriormente se extrapolaron al peso completo, para ello fue necesario considerar el peso seco y húmedo de la submuestra y el húmedo total mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Peso seco de raíces total} = \frac{(\text{Peso total fresco de raíces} \times \text{Peso seco de la submuestra}) \times 100}{\text{Peso fresco de la submuestra de raíces}}$$

3.5.2. Coeficiente alométrico entre el raíz/follaje (parte aérea)

La relación entre los pesos secos de las raíces y la parte aérea una relación alométrica del desarrollo de las plantas que puede explicar adaptaciones a estrés ambiental o deficiencias de nutrientes en el suelos (Goran y Franklin, 2003). Esta relación dependiendo de su valor refiere que tanta proporción de biomasa se acumuló en las raíces con respecto a la parte aérea (Goran y Franklin, 2003). La estimación de la relación se hizo mediante una relación directa entre el peso seco de las raíces entre el peso seco de la parte aérea mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Raíz/follaje (seco)} = \frac{\text{Peso seco de raíces}}{\text{Peso seco de tallo}}$$

3.5.3. Estimación del contenido de prolina

Para estimar la acumulación de prolina en las unidades experimentales se modificó la técnica de la reacción con ninhidrina descrita por Bates *et al.*, (1973). La ninhidrina es un oxidante que produce la aminación oxidante del grupo a-amino del aminoácido prolina, desprendiendo amonio, CO₂, el correspondiente aldehído y ninhidrina en forma reducida. El amonio reacciona con un mol adicional de ninhidrina y reduce la prolina produciendo un complejo púrpura (Reigosa, 2001).

El un día previo a la cosecha de las plantas se cortó y liofilizó la hoja bandera, es decir la hoja más larga de la planta, de cada unidad experimental. Posteriormente se maceraron 0.150 g de la muestra liofilizada con 4 mL de ácido sulfosalicílico al 3% y después se colocaron 1.5 mL del extracto acuoso en un tubo Ependorff. El extracto se centrifugó por 30 minutos a 1000 rpm en una ultracentrífuga marca Ependorff® de Estados Unidos.

Se mezclaron 400 µL de la solución centrifugada con 200 µL de ninhidrina y 200 µL de ácido acético glacial previamente agitados en un vortex y éstos se incubaron en un baño María a 80 °C por una hora. Trascorrido el tiempo de detuvo la reacción de la ninhidrina colocando las muestras en un contenedor con hielo.

Una vez parada la reacción se añadieron 800 µL de tolueno en el tubo donde se llevó la reacción y se agitó nuevamente en vortex. De éste nueva solución se colocaron 200 µL de

la fase acuosa del tolueno en una tableta de Elisa y leídas e un espectrofotómetro a una absorbancia de 520 nm utilizando el tolueno como blanco.

Adicionalmente se realizó una curva lineal de calibración con prolina comercial y tolueno con concentraciones desde 0 hasta 150 $\mu\text{g/mL}$ de prolina. Dichas concentraciones fueron analizadas del mismo modo que las hojas utilizando el tolueno como blanco. En base a la curva de absorbancia v/s concentración de prolina se obtuvo una ecuación de regresión para estimar la concentración final de prolina de cada muestra.

3.5.4. Evaluación de la colonización micorrícica

La evaluación de la colonización micorrícica se realizó a todos los tratamientos, es decir, a las unidades experimentales con inóculo micorrícico y a las plantas testigo. Es importante mencionar que las plantas testigo no se encontró colonización mayor del 1% por lo que el análisis estadístico de esas unidades fue excluido. Para evaluar la colonización micorrícica se tiñeron las raíces modificando la técnica de Phillips y Hayman (1970). Se colocaron dos gramos de raíces en hidróxido de potasio (KOH) al 10% en baño María por 20 minutos a 90 °C , posteriormente fueron colocadas en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por 20 minutos a temperatura ambiente y finalmente se tiñeron en azul tripano al 0.05% por 5 minutos a 90° C en baño María. Las raíces teñidas se almacenaron en frascos de plástico con glicerol.

Para estimar el porcentaje de colonización micorrícica por estructuras se modificó la técnica de descrita por McGonigle et al., (1990). Por cada muestra se cuantificaron dos portaobjetos con 20 raíces de al menos 1.6 cm, teñidas alineadas y alineadas paralelamente. De cada portaobjetos se contabilizaron 100 intersecciones o segmentos de raíz. Se utilizó una línea horizontal “stagegraticule” como criterio para contabilizar la presencia de arbusculos, hifas, vesículas, micelio externo y ausencia, es decir si la línea tocaba una estructura se cuantificó, de lo contrario aunque estuviera dentro del campo visual no fue considera (Fig. 4). Se utilizó un microscopio con contraste de fases Olympus® BX41 de Japón.

Es importante mencionar que en la técnica original considera como intersección cuando la línea “stagegraticule” toca o cruza una estructura micorrícica (hifa, vesícula o arbusculo) en éste sentido se podría cuantificar más de una estructura una raíz o campo óptico. Dada la

cantidad de colonización observada en las raíces para la presente investigación se consideró como intersección la raíz completa y dentro de ella la presencia o ausencia de estructuras que tocaron la línea por lo que aunque hubieran dos o más estructuras solo fue considerada una (Fig. 4).



	McGonigle <i>et al.</i> , (1990)		McGonigle <i>et al.</i> , (1990) modificado
Raíces	3	Raíces	3
Hifas	Incontables	Hifas	3
Vesículas	3	Vesículas	2
Arbúsculos	Incontables	Arbúsculos	3

Fig. 4. Método de estimación de la colonización micorrícica.

3.6. Análisis estadístico

Las variables de desempeño vegetal y la colonización micorrícica fueron evaluadas mediante un análisis de homogeneidad de varianzas para tener la certeza de la normalidad de los datos. Además se realizó un análisis de varianza de dos y tres vías en los experimentos exploratorios y el integral, respectivamente. Adicionalmente se hicieron evaluaciones de dos vías en la etapa tres para analizar los efectos por separado. En todos los casos se utilizó un test de significancia de LSD con una $p \leq 0.05$.

Se realizaron regresiones lineales en cada experimento para determinar si hay correlación entre el porcentaje de colonización y la biomasa de las plantas de la parte aérea y las raíces. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software Statgraphics CenturionXV.I.


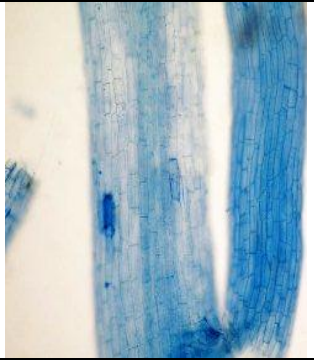
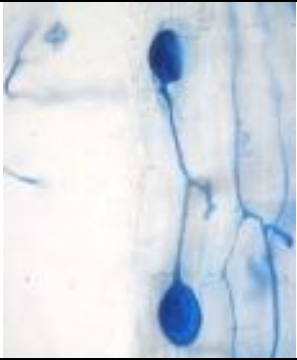


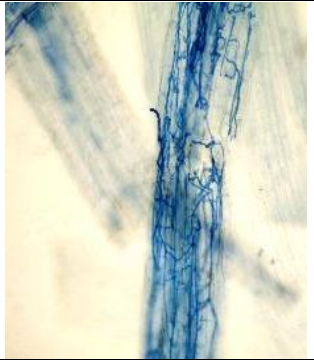
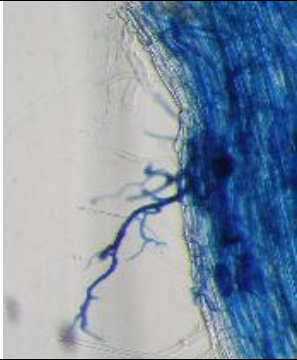

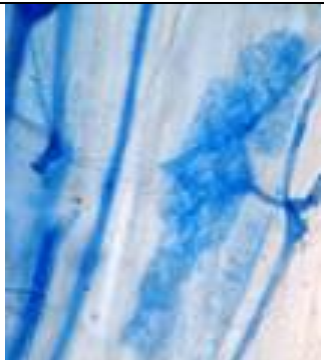
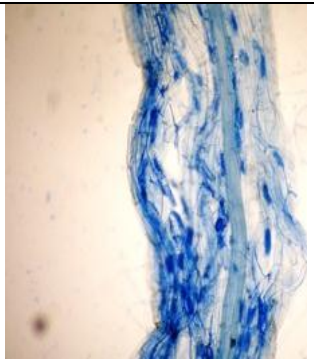
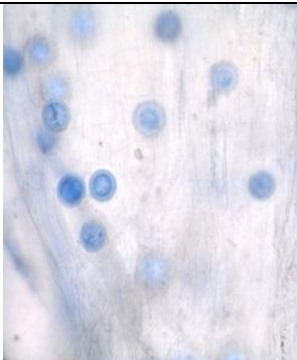
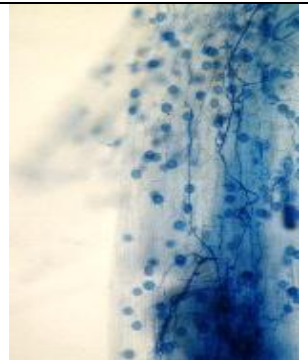
4. RESULTADOS

Los resultados se presentan en un apartado por cada experimento o etapa realizada (Ver sección 3.3), además se incluye una sección en el que se muestran los morfotipos identificados del inóculo nativo.

Los resultados de la colonización micorrícica se presentan como porcentaje de arbusculos, vesículas, hifas observadas adheridas a la epidermis de la raíz pero fuera de ella y micorrización total (Cuadro 5). Es importante mencionar que en algunas intersecciones se encontraron estructuras de microorganismos distintos a los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Cuadro 5).

En los resultados no fueron considerados para el análisis estadístico los resultados del porcentaje de colonización de los tratamientos testigo (sin inóculo) solo algunas muestras presentaron colonización inferior al 1% por lo que se propone que éste porcentaje no tuvo un efecto significativo en las variables estudiadas. Por lo anterior solo fue considerado para el análisis estadístico de la colonización micorrícica los resultados de *R. intraradices* y el inóculo nativo como tratamientos. La contaminación de las plantas testigo podría atribuirse al viento en el invernadero.

Cuadro 5. Estructuras de hongos micorrícicos arbusculares de raíces de maíz híbrido micorrizado.

Testigo	2000x	200x	Vesículas	2000x	800x
					
Hifas	2000x	200x	Hifas externas adheridas a raíz	800x	200x
					
Arbúsculos	2000x	200x	Otros (oosporas)	2000x	200x
					




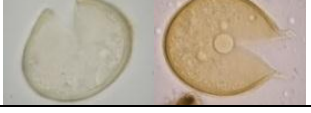
4.1. Identificación de morfotipos del inóculo nativo






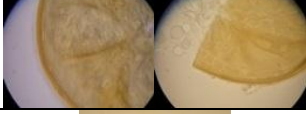








Los morfotipos se clasificaron en base a su color (ámbar, ámbar-transparente, amarilla, amarilla-transparente, hialinas ó café), forma (circular, ovaladas y en forma de pera), grosor de la pared con respecto al contenido de la espora (muy gruesa, gruesa, media, delgada), ornamento de la pared (moteada, lisa, con burbujas) y tamaño en milímetros (Cuadro 6). Es importante menar que la clasificación de morfotipos fue echa por el autor, que no es experto en taxonomía de los HMA, razón por la cual el número reportado de morfotipos no necesariamente corresponde al de especies.

En las tres muestras de suelo se identificaron 18 morfotipos, los cuales fueron clasificados como especies de los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* e *Intraspora*. *Glomus* fue el género más dominante con 38.9% de los morfotipos, seguido de *Acaulospora* con 33.3% y *Gigaspora* e *Intraspora* con 5.6% cada una. Finalmente el 16.2 % de los morfotipos no se pudieron identificar, dado que las esporas eran muy pequeñas y en su mayoría transparentes pero viables.

Los morfotipos del género *Glomus* y *Acaulospora* se encontraron en las tres muestras de suelo, mientras que *Gigaspora* e *Intraesporas* solo fueron encontradas en una muestra (Cuadro 6).

Cuadro 6. Morfotipos encontrados en el suelo utilizado como inóculo nativo.

No	Color	Diámetro (mm)	Pared/ Ornamento	Género	Fotografías (x100)
1	Ámbar-transparente	10,14	Transparente, con burbujas	<i>Glomus</i>	
2	Amarilla	14	Transparente con burbujas	<i>Acaulospora</i>	
3	Amarillo transparente	9,8	Transparente con burbujas	<i>Glomus</i>	
4	Hialina	16, 18	Delgada con burbujas	<i>Acaulospora</i>	

No	Color	Diámetro (mm)	Pared/Ornamento	Género	Fotografías (x100)
5	Ámbar	15	Gruesa moteada	<i>Acaulospora</i>	
6	Ámbar	13,10	Gruesa	<i>Glomus</i>	
7	Ámbar	15	Gruesa con rallas	<i>Gigaspora</i>	
8	Ámbar	10	Gruesa con gotas	<i>Glomus</i>	
9	Ámbar	7	Media sin ornamento	<i>Glomus</i>	
10	Café transparente	29	Gruesa Moteada	<i>Acaulospora</i>	
11	Hialina	7	Delgada transparente	¿?	
12	Café	11,11	Moteada y delgada transparente	<i>Acaulospora</i>	
13	Hialina	6	Gruesa transparente	<i>Intraspora</i>	
14	Ámbar transparente	8	Gruesa amarilla	<i>Glomus</i>	
15	Ámbar	12	Chica	¿?	
16	Ámbar obscura	8	Delgada y con basura adherida	<i>Glomus</i>	
17	Hialina	15x20	Muy delegada Ovalada	¿?	
18	Amarilla transparente	15	Media	<i>Acaulospora</i>	

4.2. Efecto de tres niveles de irrigación en el desarrollo de HMA en maíz.

En éste experimento se evaluó el efecto tres niveles de irrigación sobre el desarrollo de las plantas de maíz y la colonización de los HMA. El efecto individual y la interacción entre los HMA e irrigación fueron significativos ($p \leq 0.01$) en la respuesta del peso seco tanto de la parte aérea como de las raíces (Cuadro 7). Por su parte la el coeficiente alométrico entre el la raíz/follaje (parte aérea) tuvo un efecto significativo solo en el factor inóculo y la interacción entre factores (inóculo x irrigación). El inóculo y la irrigación afectaron el desarrollo de la colonización micorrícica, de sus estructuras y del micelio externo de manera independiente, pero la interacción de los factores solo fue significativa en el porcentaje de micorrización total (Cuadro 7).

Cuadro 7. Valores de p del análisis de varianza para el desempeño vegetal y colonización de raíces bajo tres tratamientos de irrigación. *= $p \leq 0.05$, **= $p \leq 0.01$.

Factores	DESEMPEÑO VEGETAL			COLONIZACIÓN DE HMA			
	Peso seco aéreo	Peso seco raíz	Raíz/Tallo	Total	Vesícula	Arbúsculo	Hifas externas
Inóculo	***	***	0.0907	***	***	***	***
Irrigación	***	***	***	***	***	***	***
Ir X In	***	***	***	*	0.1358	0.0669	0.1239

Ir=irrigación; In= inóculo

A los 18 días después de la siembra se observó una evidente disminución del crecimiento en las alturas de las plantas con inóculo nativo y *R. intraradices* con respecto al testigo, lo que implica que el efecto de los inóculos inició antes de comenzar los tratamientos de irrigación (21 días) (Fig. 5).

Es importante notar que el inóculo nativo promovió un incremento significativo en el promedio de alturas solo durante los primeros 15 días de crecimiento; sin embargo, una vez que iniciaron los tres tratamientos de irrigación hubo una reducción significativa en la altura de las plantas con respecto al testigo (Fig. 5).

Los efectos en la altura ocasionados por la falta de riego y del inóculo fueron observados después de los 25 días de la siembra y dicha tendencia se mantuvo durante el resto del

experimento. Fue posible diferenciar a simple vista los tratamientos que desarrollaron mayor altura (testigo) de los que tuvieron el menor desarrollo vegetativo (inóculo nativo y *R. intraradices*) (Fig. 5; Fig. 7a).

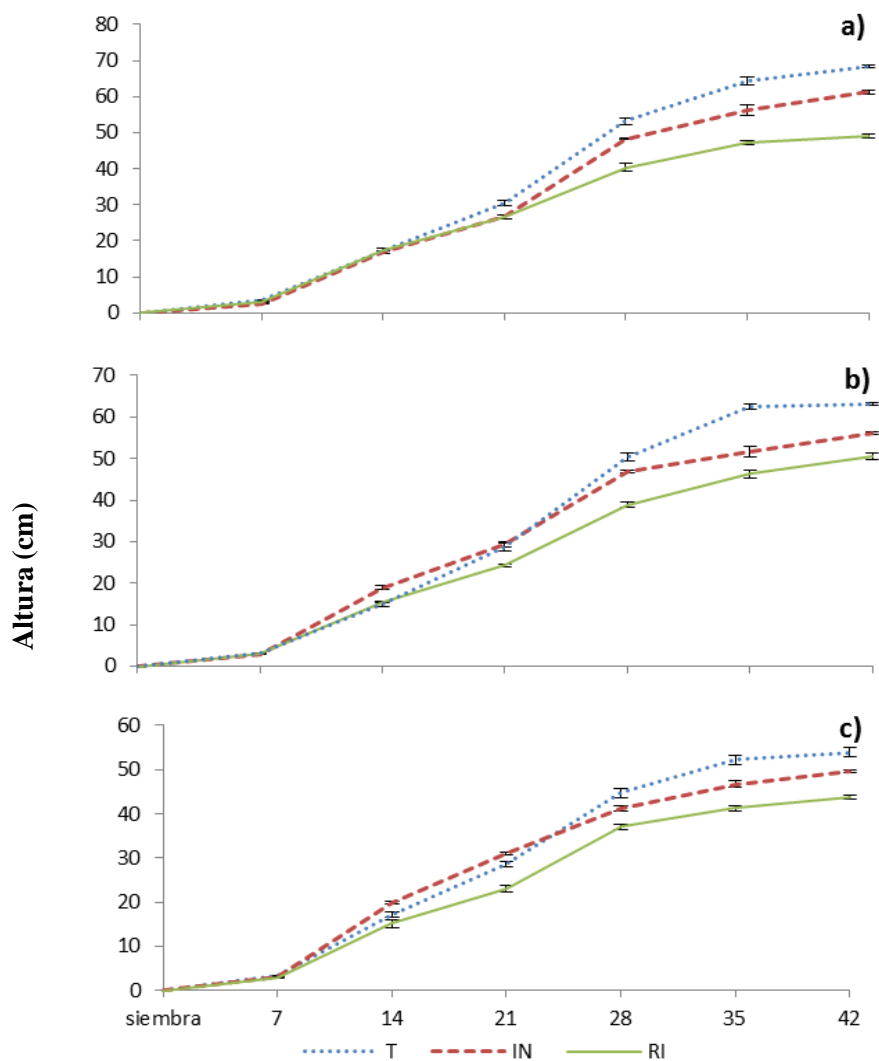


Fig. 5. Altura de las plantas de maíz híbrido micorrizado y un testigo bajo tres tratamientos de irrigación durante 42 días de crecimiento. Cada punto corresponde al promedio de la altura medida cada séptimo día, con una n=6, las barras son el error estándar. a) Tratamiento de 85 % de CC; b) Tratamiento de 65 % de CC; c) Tratamiento de 45 % de CC. Los inóculos se identifican como: T= testigo; IN= inóculo nativo; RI= Rhizophagus intraradices.

En concordancia con el análisis de alturas, las plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* y el inóculo nativo irrigados al 85% de CC redujeron significativamente ($p \leq 0.05$) el peso seco de las raíces y el follaje con respecto al testigo (Fig. 6).

En contraste, los tratamientos inoculados y el testigo fueron estadísticamente iguales en el peso seco de las raíces y el follaje cuando se mantuvo la irrigación al 45% de CC. Por su parte el nivel de irrigación al 65 % de CC se comportó en una fase transicional entre los tratamientos con mayor y menor irrigación (85 y 45 % de CC) (Fig. 6; Fig. 7a)

En términos generales, las plantas testigo y con el inóculo nativo acumularon más biomasa en las raíces y el follaje entre mayor fue la irrigación aplicada, mientras que las plantas inoculadas con *R. intraradices* solo presentaron diferencias significativas a 85 % de CC para la parte aérea (Fig. 6; Fig. 7a). Por su parte, las raíces de las plantas inoculadas y no inoculadas tuvieron estadísticamente la misma materia seca (Fig. 6; Fig. 7a).

Es importante mencionar que entre los días 21 al 35 después de la siembra, las hojas de las plantas inoculadas e irrigadas con 45 % de CC presentaron una coloración de rojiza a morada lo que sugirió síntomas de deficiencias de fósforo (Fig. 6b y c). En general, las hojas cuya coloración fue muy oscura se secaron aproximadamente a los 30 días de crecimiento pero los nuevos brotes crecieron con una coloración verde oscura. Es importante mencionar que en las plantas testigo el obscurecimiento de las hojas casi fue nulo (Fig. 6 a, c y d).

En el caso de las plantas irrigadas al 85 % de CC los síntomas de deficiencia de fósforo fueron muy poco observados, aunque al igual que en los tratamientos con poca irrigación, la mayor incidencia se observó en las plantas con *R. intraradices* mientras que las plantas testigos tuvieron un desarrollo sin deficiencias de fósforo (Fig. 6 d).

Otro síntoma observado solo en el tratamiento con 45 % de CC tanto en las plantas inoculadas y no inoculadas fue la senescencia de hojas durante los primeros días de reducción de la irrigación, lo cual sugiere que las plantas desarrollaron estrés hídrico (Fig. 6b).

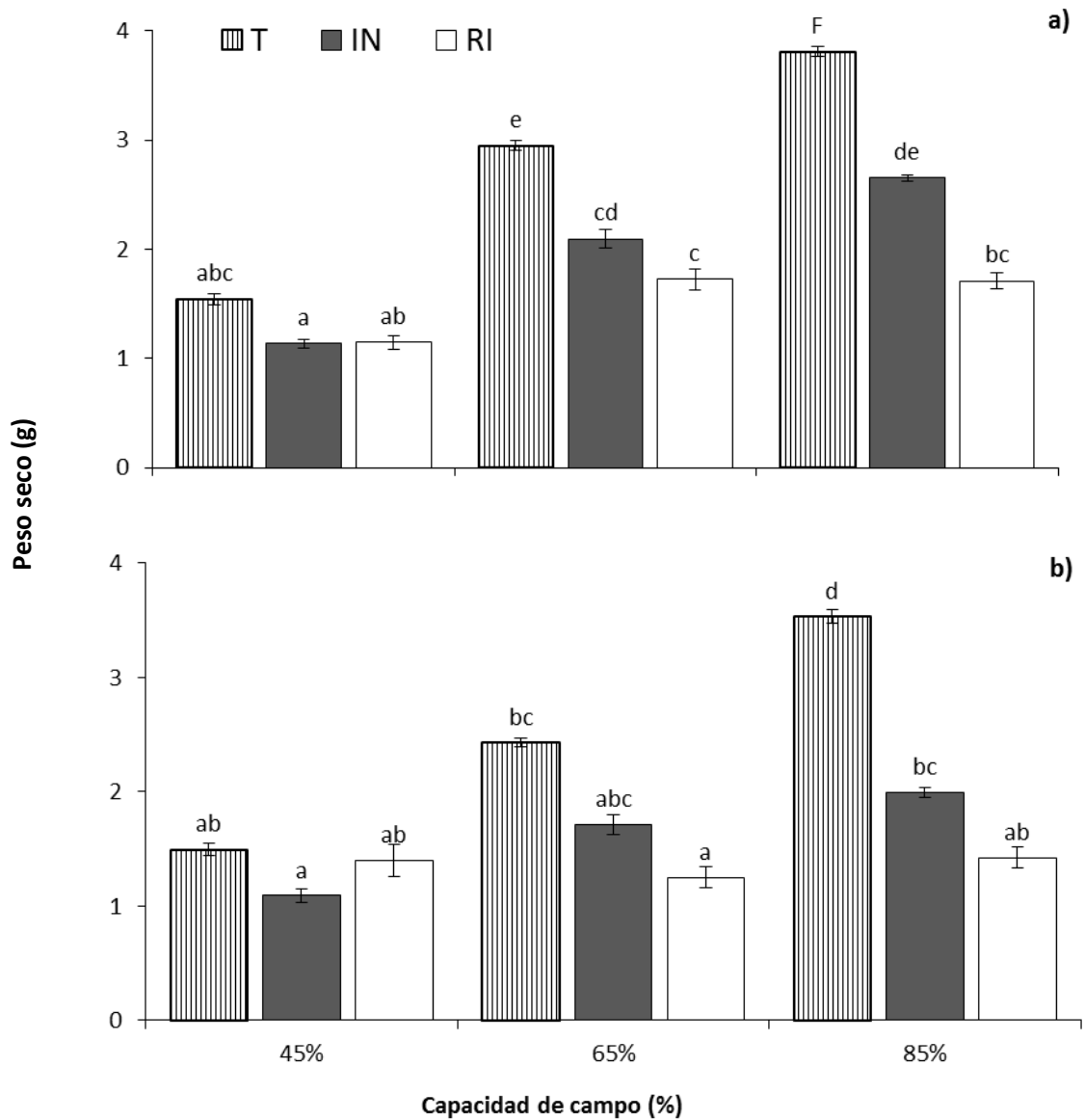


Fig. 6. Efecto de tres niveles de irrigación sobre el desempeño vegetal del maíz híbrido con y sin micorrizas. Se muestra la media de peso seco más barras de error estándar estimados con una n=6, analizados con una prueba de LSD con 0.05%. a) peso seco en parte aérea; b) Peso seco en raíces. T= Testigo, RI= *Rhizophagus intraradices*, IN= Inóculo nativo

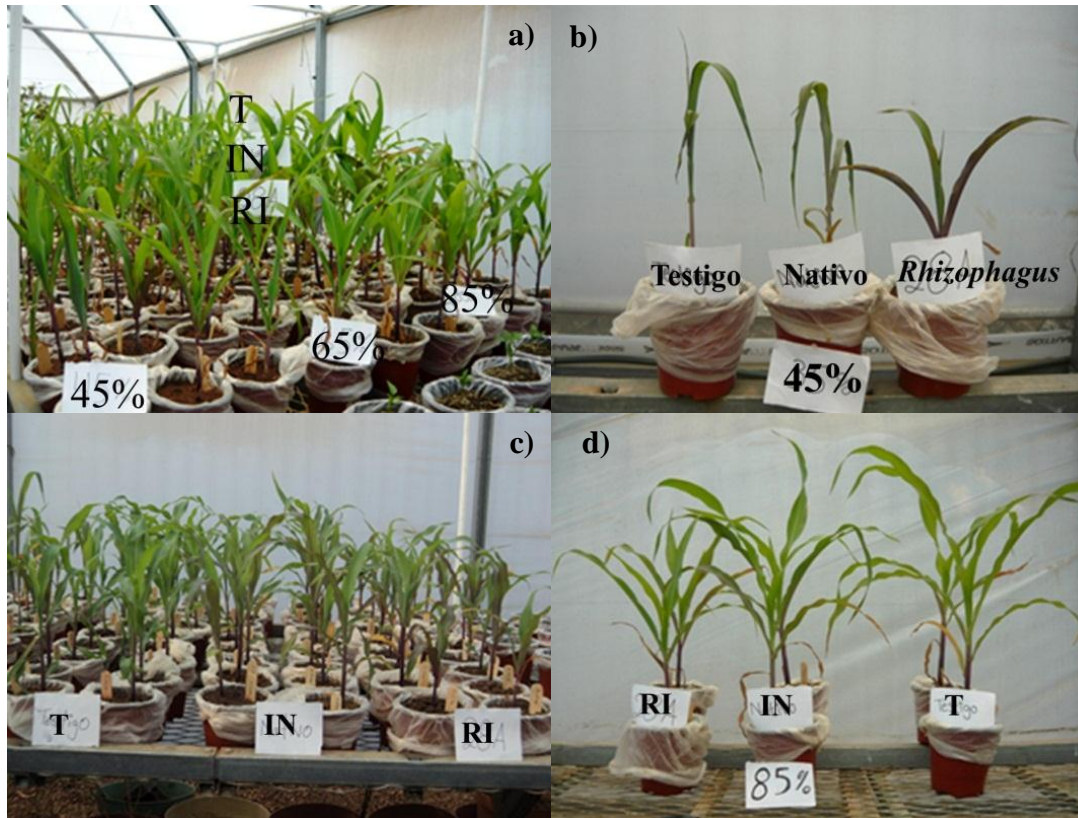


Fig. 7. Desarrollo observado de plantas de maíz con y sin micorrizas bajo tres niveles de irrigación. a) Plantas a los 42 días de crecimiento, se ilustran los niveles de irrigación y los tratamientos: T= testigo; IN= inóculo nativo; RI= *Rhizophagus intraradices*. b) Plantas a los 28 días de crecimiento, se muestran una planta típica de cada tratamiento a 45% de CC. c) Comparación de plantas micorrizadas y no micorrizadas a los 21 días de crecimiento. d) Comparación de plantas típicas a los 42 días de crecimiento bajo el tratamiento de 85% de CC.

La relación raíz/follaje (parte aérea) mostró que solo el tratamiento con 45 % de CC de *R. intraradices* produjo significativamente más raíces que follaje, además dicha cepa también fue la que creció significativamente menos que todos los demás tratamientos a los 42 días de crecimiento (Fig. 8; Fig. 5c).

La relación raíz/follaje (parte aérea) del inóculo nativo y del testigo con irrigación al 45 % de CC y de *R. intraradices* al 85 % de CC tuvieron valores muy cercanos a uno, por lo que estadísticamente la parte aérea y las raíces estuvieron un desarrollo muy en términos de biomasa muy similar. La mayoría de los tratamientos con 85 y 65 % de CC la relación mostró un mayor desarrollo del follaje que de las raíces (Fig. 8).

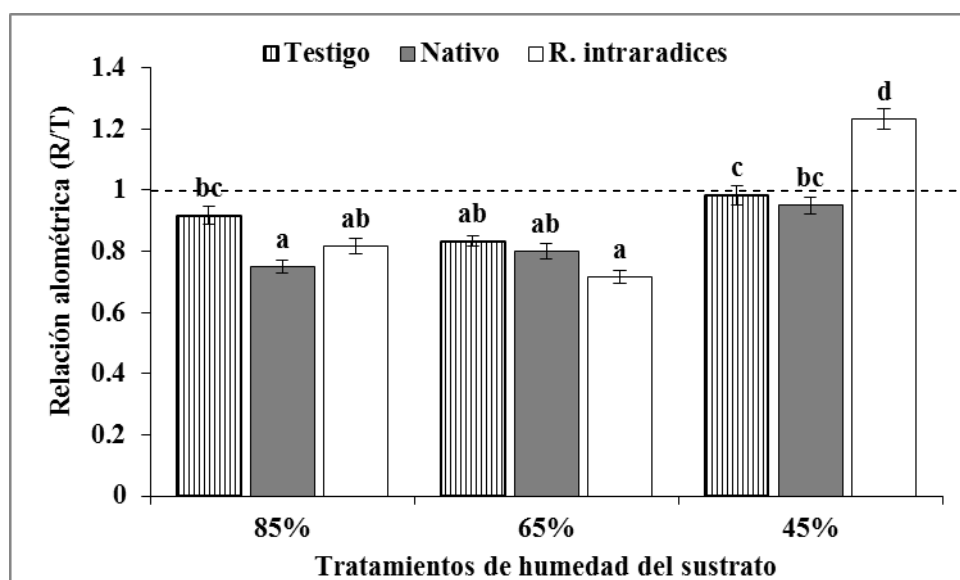


Fig. 8. Relación raíz/follaje (parte aérea) de bajo tres tratamientos de irrigación analizados con un Test de LSD con $p \leq 0.05$. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una $n=6$. T= testigo, IN= inóculo nativo, RI= *R. intraradices*.

El mayor porcentaje de colonización micorrícica se encontró en los tratamientos con 45% de CC, además *Rhizophagus intraradices* demostró tener una mayor capacidad de colonización que el inóculo nativo. En contraste, los tratamientos con *R. intraradices* y el inóculo nativo irrigados al 85 % de CC tuvieron un porcentaje de colonización similar de colonización micorrícica (Fig. 9 a).

Considerando el mismo nivel de irrigación (45, 65 ó 85 % de CC) el porcentaje de colonización de arbusculos siempre fue superior al de vesículas tanto en el inóculo nativo como en *R. intraradices* (Fig. 9 c y d). No se encontró un efecto de la irrigación sobre el porcentaje de colonización de vesículas y arbusculos en el inóculo nativo. En contraste, la irrigación a 45 % de CC promovió significativamente mayor colonización de vesículas y arbusculos en *R. intraradices*, pero el tratamiento con 65 % de CC fue similar al resto de niveles de irrigación (Fig. 9 c y d).

En concordancia con los resultados anteriores, en el tratamiento con 45 % de CC se encontró mayor desarrollo del micelio externo en *R. intraradices*, pero no se encontraron diferencias significativas en el micelio externo del inóculo nativo entre los diferentes tratamientos de irrigación (Fig. 9b).

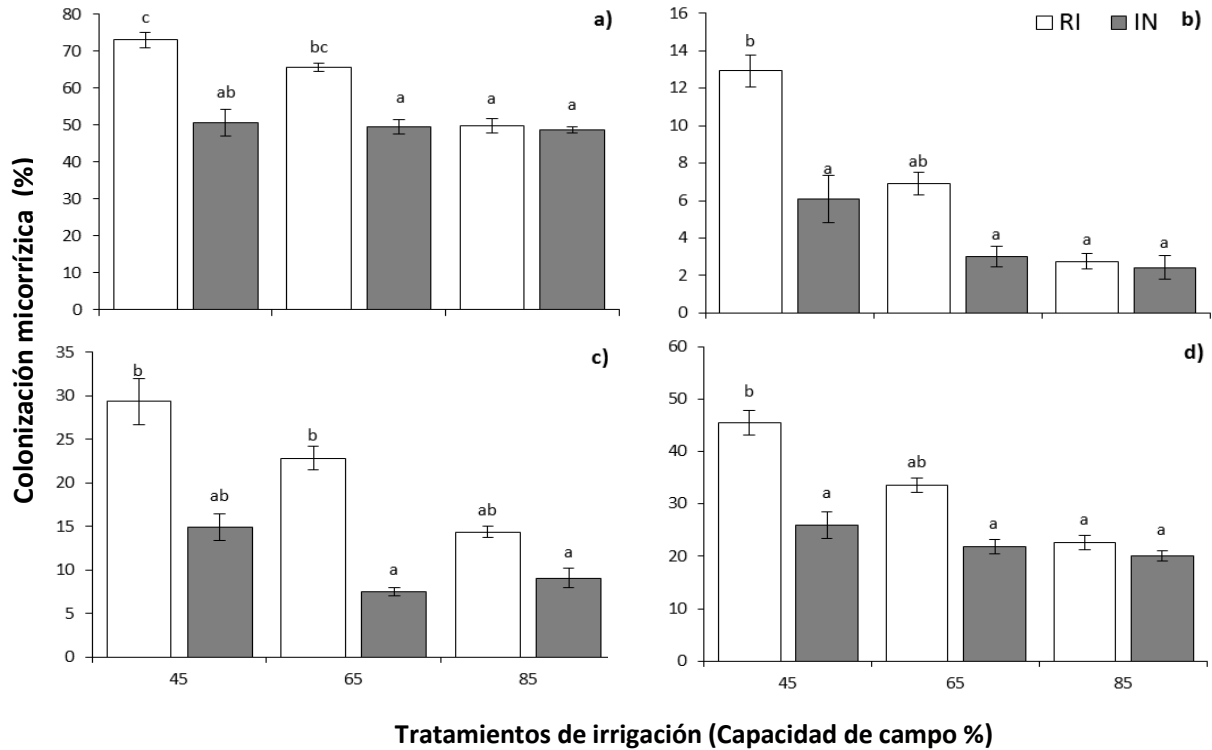


Fig. 9. Efecto de tres niveles de irrigación sobre el desarrollo de estructuras micorrícicas de *Rhizophagus intraradices* y un inóculo nativo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=6 y analizados con una prueba de LSD con 0.05%. a) Colonización total; b) Micelio externo observado; c) Vesículas; d) Arbusculos. RI= *Rhizophagus intraradices*, IN= inóculo nativo

Estadísticamente hubo un efecto significativo de la irrigación con respecto a la colonización y desarrollo de estructuras micorrícicas, dicho efecto fue contrastante entre 45 y 85 % de CC por lo que éstos niveles de irrigación fueron seleccionados para el diseño de la última fase experimental.

Con base en el análisis de correlación se encontró que no hay relación estadísticamente significativa entre la colonización micorrícica y el peso seco de la parte aérea y las raíces, además, la mayoría de los coeficientes de correlación de fueron $R^2 \leq 0.5$ (Anexo 1 Anexo 2)

4.3. Efecto de la fertilización mineral en el desarrollo de HMA en maíz

En ésta sección se muestran los resultados obtenidos de la segunda etapa experimental. Se realizó un experimento en el que se aplicó macro y micro nutrientes al 100% variando solo la dosis de fósforo en 0, 7.5, 15 y 30 mg de P/semana/kg de sustrato (0, 36, 72, 144 mg de P totales). Los diferentes tratamientos de fertilización tuvieron efecto solo en la colonización de vesículas, por su parte los inóculos tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0.01$) en la respuesta del peso seco aéreo y en las raíces, así como en el desarrollo de las estructuras micorrícicas. La interacción de los factores solo fue significativa para el porcentaje de colonización de vesículas (Cuadro 8). Por su parte la relación alométrica raíz/parte aérea no presentó ningún efecto estadístico bajo ningún tratamiento de fertilización o inóculos.

Cuadro 8. Valores de p del análisis de varianza para el desempeño vegetal y colonización de raíces bajo tratamientos de fertilización. *= $p \leq 0.05$, ***= $p \leq 0.01$.

Factores	DESEMPEÑO VEGETAL			COLONIZACIÓN			
	Peso seco aéreo	Peso seco raíz	Raíz/Follaje	Total	Vesícula	Arbúsculo	Hifas externas
Fertilización	*	0.185	0.275	0.664	0.560	0.811	0.306
Inóculo	***	***	0.892	***	***	***	***
F*I	0.4793	0.4247	0.575	0.442	*	0.417	0.163

I=inóculo y F= Fertilización

A los 42 días después de la siembra, ningún tratamiento de fertilización tuvo efecto significativo ($p \leq 0.05$) en altura en las plantas del inóculo nativo, *R. intraradices* ó sin inóculo (testigo.) por lo tanto, el efecto en las alturas solo se debió a los inóculos (Fig. 10; Cuadro 8).

Después de los 18 días de la siembra, fue posible observar una reducción significativa de la altura de las plantas del inóculo nativo con respecto al testigo y a *R. intraradices*, además dicha reducción fue posible observar hasta la cosecha de las plantas (Fig. 10). Si bien en la cosecha (42 días) las plantas con inóculo nativo y fertilizadas con 144 mg/P fueron estadísticamente más pequeñas que las inoculadas con *R. intraradices* y sin inóculo (testigo), la diferencia entre las alturas fue menor que las observadas en el resto de tratamientos de fertilización (Fig. 10d, Cuadro 8).

Las plantas inoculadas con *R. intraradices* y las plantas testigo prácticamente tuvieron la misma altura durante todo el experimento, únicamente entre los días 22 al 30 en los tratamientos con 0, 36 y 72 mg/P se registró una reducción del crecimiento de las plantas inoculadas, pero la altura fue similar antes de la cosecha (Fig. 10a, b y c).

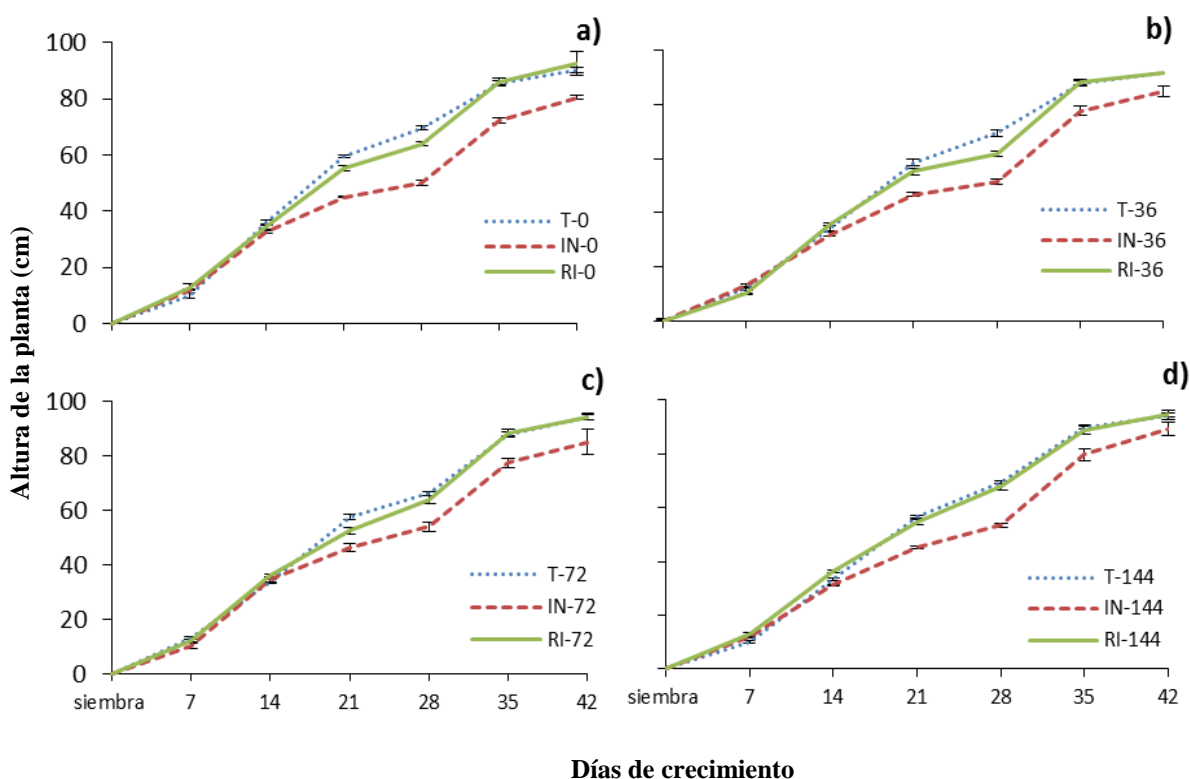


Fig. 10. Altura de las plantas de maíz híbrido con y sin micorriza bajo cuatro tratamientos de fertilización fosfatada durante 42 días de crecimiento. En cada punto se muestra la altura el promedio medida cada séptimo día, con barras de error estándar, analizados con una prueba de LSD a partir de una $n=6$. a) 0 mg de P; b) 36 mg de P; c) 72 mg de P; d) 144 mg de P. T= testigo; IN= inóculo nativo; RI= *Rhizophagus intraradices*. Se muestra el promedio con error estándar de la altura medida cada séptimo día.

Las plantas con inóculo nativo tuvieron estadísticamente ($p \leq 0.05$) la menor biomasa en la parte aérea y en las raíces con respecto a las plantas inoculadas con *R. intraradices* y el testigo. Además, ningún tratamiento del inóculo nativo fue estadísticamente diferente, lo cual concuerda con los resultados de la ganancia de altura de las plantas del inóculo nativo (Fig. 11a, b; Fig. 13),

Por su parte la materia seca en las raíces de las plantas sin inóculo (testigo) y las inoculadas con *R. intraradices* fue muy similar entre todas las dosis de fertilización, sin embargo, es posible observar que las plantas con *R. intraradices* tienden a tener una mayor biomasa que las plantas testigo, aunque ésta tendencia no fue estadísticamente significativa a los 42 días de la siembra de las plantas (Fig. 11a, b; Fig. 13).

Las plantas con el inóculo nativo fueron las tuvieron menos peso seco tanto en las raíces como en la parte aérea y además ningún tratamiento de fertilización tuvo un efecto significativo, en otras palabras, la biomasa de las plantas con inóculo nativo fue igual en todos los tratamientos de fertilización (Fig. 11a, b; Fig. 13).

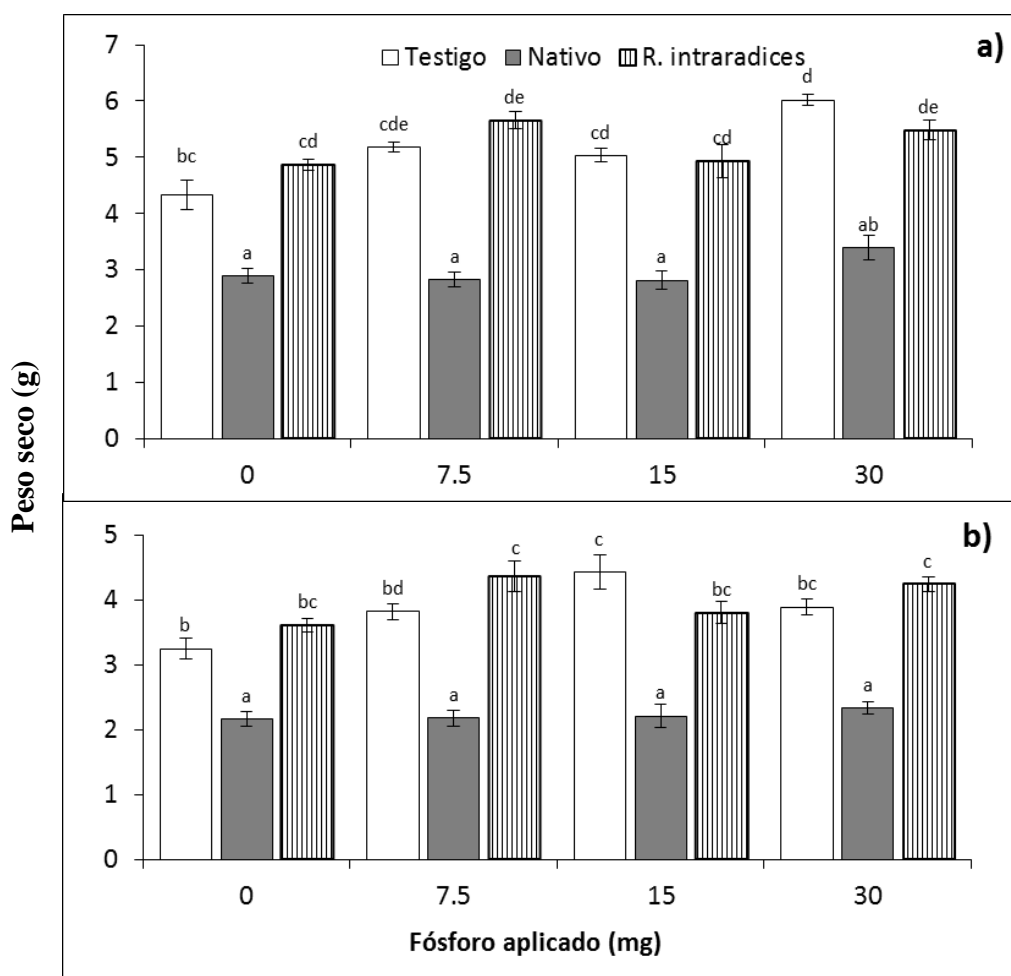


Fig. 11. Efecto de cuatro tratamientos fertilización mineral en la ganancia de peso seco de maíz híbrido micorrizado. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=6 y analizados con una prueba de LSD con 0.05%. a) peso seco en parte aérea; b) Peso seco en raíces. Se muestra la media de peso seco más error estándar, analizados con un test de LSD con 0.05%.

En términos generales, la relación raíz/follaje (parte aérea) mostró que las cuatro dosis de fertilización con fósforo (0, 36, 72 y 144 mg /P) estimularon un mayor desarrollo de la parte aérea que las raíces en las plantas con inóculo nativo, con *R. intraradices* y las testigo (Fig. 12). Es importante observar que solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos de *R. intraradices* y el testigo con 15 mg/P y el testigo fertilizado con 30 mg/P, el resto de los tratamientos tuvieron estadísticamente la misma la relación raíz/follaje (parte aérea) (Fig. 12).

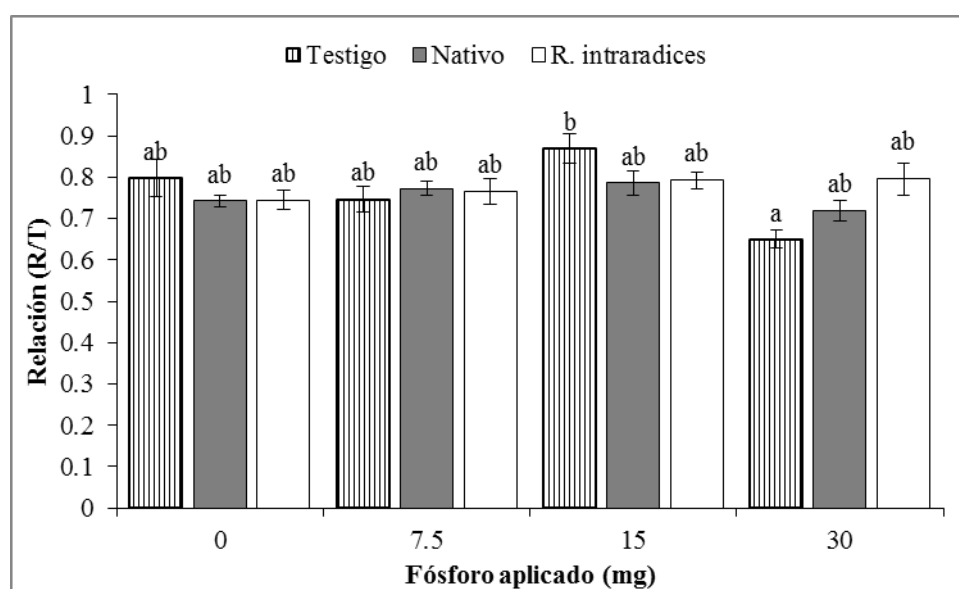


Fig. 12. Relación raíz/follaje (parte aérea) de plantas de maíz micorrizadas bajo cuatro tratamientos de fertilización mineral. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una $n=6$ y analizados con un test de LSD con $p \leq 0.05\%$. T= testigo, IN= inóculo nativo, RI= *R. intraradices*

Se observó, desde los 14 días de crecimiento hasta la cosecha, una coloración morada en los tallos de las plantas en todos los tratamientos, pero no fue posible determinar si se debió a estrés o a una condición intrínseca de las plantas (Fig. 13a). Solo durante los 21 y 28 días de crecimiento, en las plantas con inóculo nativo se presentó una tenue coloración rojiza-café en las hojas más largas indicando una leve deficiencia de fósforo, pero ésta desapareció en días después de la siguiente aplicación de fósforo (Fig. 13c). Las plantas testigo y las inoculadas con *Rhizophagus intraradices* se mantuvieron con

una coloración verde y las hojas con una textura fibrosa prácticamente durante el desarrollo de todo el experimento (Fig. 13).

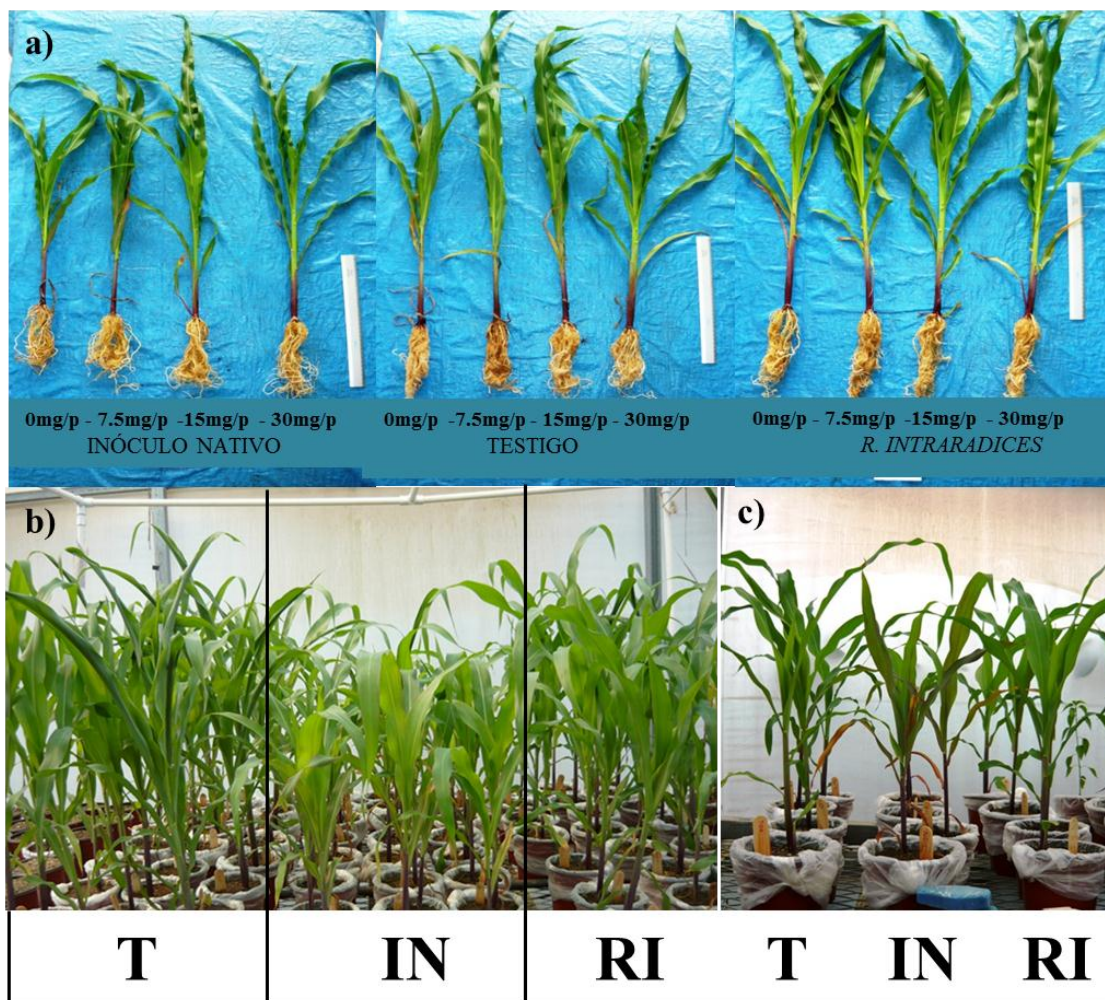


Fig. 13. Desarrollo de plantas de maíz híbrido micorrizado bajo cuatro tratamientos de fertilización mineral. a) Plantas a los 42 días de crecimiento, se ilustra el inóculo nativo, *Rhizophagus intraradices* y el testigo con una planta promedio de cada tratamiento de fertilización. b) Plantas a los 28 días de crecimiento. c) Comparación de plantas inoculadas y no inoculadas a los 14 días de crecimiento. T= testigo; IN= inóculo nativo; RI= *R. intraradices*

El análisis de varianza de dos vías con base al inóculo y la fertilización mineral como factores presentó un patrón similar al porcentaje de colonización micorrícica. Dicho análisis indicó que solo el tipo de inóculo tuvo un efecto significativo y de ellos el que tuvo mayor micorrización fue *R. intraradices* (Cuadro 8; Fig. 14a).

En todos los tratamientos, el porcentaje de colonización micorrícica total de *R. intraradices* superó por casi el doble al inóculo nativo, sin embargo, la micorrización de cada inóculo fue estadísticamente similar en todas las dosis de fósforo aplicadas (Fig. 14a).

El desarrollo de vesículas mostró un patrón similar a la colonización total, sin embargo el porcentaje de *R. intraradices* en los tratamientos sin fósforo y con 144 mg/P superaron por más de tres veces al inóculo nativo (Fig. 14d).

El porcentaje de colonización por vesículas de *R. intraradices* se favoreció cuando se aplicó fertilización sin fósforo, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el tratamientos de fertilización sin fósforo y la dosis más alta de fósforo aplicado (144mg/P). Además, ninguna dosis de fertilización afectó estadísticamente el desarrollo de vesículas en el inóculo nativo (Fig. 14d).

El porcentaje de colonización de arbusculos del inóculo nativo disminuyó entre mayor fue la dosis de fósforo aplicada. Dicha tendencia fue inversa en el porcentaje de arbusculos de *R. intraradices* lo que podría implicar una mayor actividad funcional de la cepa pero ésta no necesariamente se puede traducirse en un incremento en producción de biomasa de las plantas (Fig. 14c).

No se encontró un patrón claro en el porcentaje de colonización de micelio externo. Los tratamientos con 36 y 72 mg/P fueron estadísticamente similares entre *R. intraradices* y el inóculo nativo. Por el contrario, entre 0 y 144 mg/P se encontraron diferencias claras entre el inóculo nativo y *R. intraradices* además éste último desarrolló la mayor cantidad de micelio externo (Fig. 14b).

Tomando en cuenta que no se encontró efecto estadístico de la fertilización sobre la colonización micorrícica, es interesante resaltar que el inóculo nativo tuvo un porcentaje de colonización promedio de 33 % mientras el de *R. intraradices* fue de 77%.

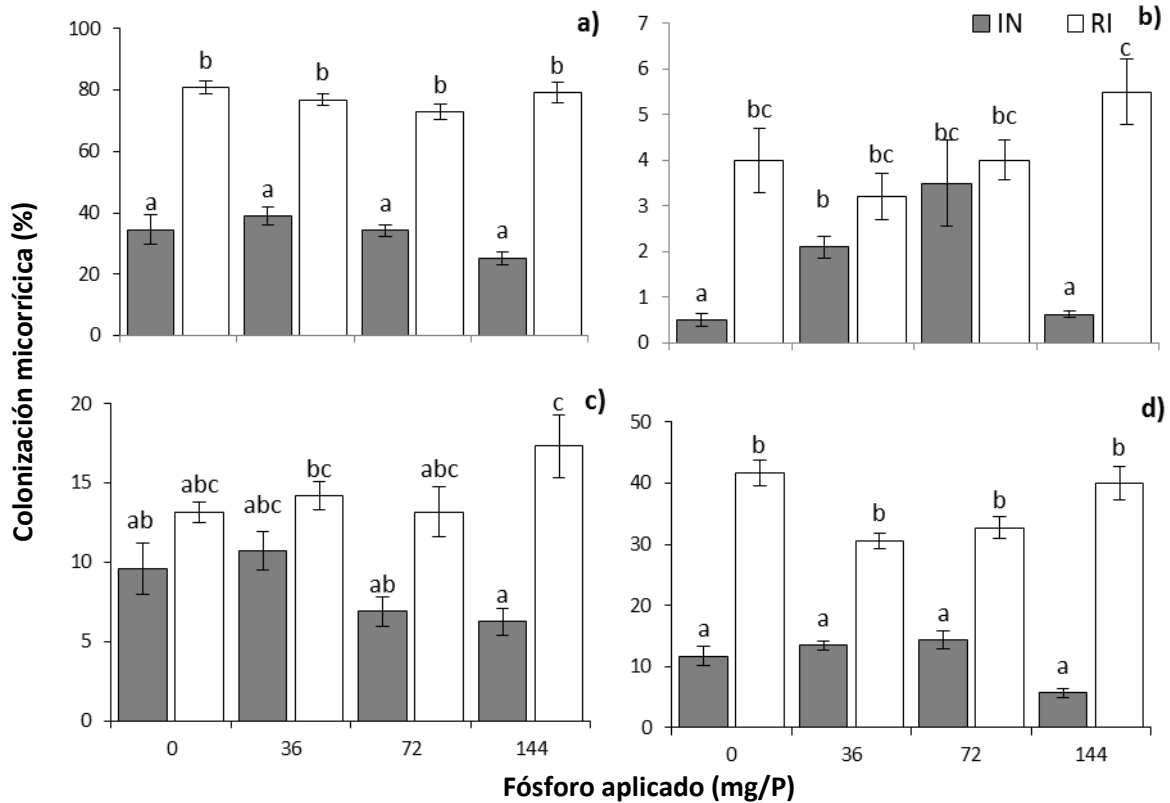


Fig. 14. Efecto de cuatro dosis de fertilización mineral sobre el desarrollo de estructuras micorrícicas de *Rhizophagus intraradices* y un inóculo nativo. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=6 y analizados con una prueba de LSD con $p \leq 0.05\%$. IN =inóculo nativo, RI= *R. intraradices*. a) Colonización total; b) Micelio externo; c) Arbúsculos; d) Vesículas.

Al igual que en la fase experimental anterior, no se encontró ninguna correlación significativa entre la colonización total y el peso seco de la parte aérea y del follaje ($p \leq 0.05$). Solo dos correlaciones tuvieron una $p \leq 0.01$ y ambas se determinaron entre el porcentaje de colonización micorrícica de *R. intraradices* y peso seco de raíces con 36 mg/P ($p=0.06$ y $R^2=61$) y con 72 mg/P de follaje ($p=0.06$ y $R^2=0.01$) (Anexo 3).

4.4. Evaluación de la interacción entre estrés hídrico y fertilización mineral en el desarrollo de HMA y maíz híbrido.

En la presente sección se abordan los resultados obtenidos de un experimento integral que fue diseñado con base en los resultados contrastantes de los experimentos previos (sección 4.2 y 4.3). El objetivo fue determinar el efecto de la interacción entre tres niveles de fertilización (macro y micronutrientes al 100% (+P), macro y micronutrientes sin aplicación de fósforo (-P) y sin fertilización (0)) y dos niveles de irrigación (45 y 85% de CC) sobre el desarrollo de los HMA y las plantas de maíz híbrido.

El análisis de varianza de tres vías (Inoculo x Fertilización x Irrigación) mostró un efecto altamente significativo ($p \leq 0.01$) en la respuesta individual de cada factor, así como en las interacciones dobles y triple con respecto a la acumulación de materia seca en la parte aérea y en las raíces (Cuadro 9).

Por su parte el análisis de la colonización micorrícica no mostró ningún patrón aparente en el efecto individual o en la interacción de los factores. Solo la fertilización tuvo un efecto significativo en la respuesta de todos los porcentajes de colonización de todas las estructuras micorrícicas evaluadas, mientras que la irrigación solo tuvo efecto en la colonización de vesículas y arbusculos (Cuadro 9).

No hubo diferencias estadísticas en el efecto de ninguna interacción doble o triple sobre la colonización total. Mientras que el porcentaje de colonización de arbusculos fue significativo para las interacciones de la irrigación con la fertilización y el inóculo. Por su parte, la interacción inóculo-fertilización solo tuvo efecto en el desarrollo de vesículas. Finalmente, la interacción tripe (irrigación-inóculo-fertilización) no tuvo efecto sobre el desarrollo del inóculo nativo ni de *R. intraradices* (Cuadro 9).

La acumulación de prolina como indicador de estrés hídrico solo mostró ser significativa para la irrigación y la interacción entre fertilización-irrigación, lo cual concuerda con lo esperado y podría indicar que las plantas con mayor síntesis de prolina desarrollaron estrés hídrico (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de p de un análisis de análisis de varianza de la interacción entre el inóculo, fertilización e irrigación para el desempeño vegetal y colonización de raíces bajo. * $p \leq 0.05$ * $p \leq 0.01$.**

Efectos	Desempeño vegetal			Colonización micorrícica			Hifas externas	Prolina
	Aéreo	Raíz	Raíz/Aéreo	Total	Vesícula	Arbúsculo		
Inóculo	***	***	0.259	***	***	0.6188	0.727	0.556
Irrigación	***	***	***	0.271	***	*	0.861	***
Fertilización	***	***	***	***	***	*	***	0.25
Inoc.*Irrig.	***	***	0.054	***	0.673	***	0.603	0.379
Inoc.*Fert.	***	***	0.228	0.63	***	0.079	***	0.176
Fert.*Irrig.	***	***	0.38	0.083	0.086	*	0.528	*
Inoc*Irrig.*Fert.	*	***	***	0.109	0.029	0.836	0.273	0.188

Se pudieron observar algunos de los efectos de los tratamientos de la fertilización, la irrigación y el inóculo en la altura de las plantas desde la etapa de crecimiento en el invernadero (Fig. 15; Fig. 16d y f). Se encontró un patrón de crecimiento en las plantas con 85% de CC con respecto a los tratamientos de fertilización (+P, -P y 0), en donde las plantas inoculadas tuvieron una disminución en la altura con respecto al testigo, además el inóculo nativo fue el que tuvo la menor altura (Fig. 15a, c, e; Fig. 16d y f).

Por el contrario, en todos los niveles de fertilización irrigados al 45 % de CC el inóculo nativo tuvo más altura que *R. intraradices*, además éste último en todos los tratamientos fue el que desarrolló la menor altura. Cuando no se aplicó ningún fertilizante (0), el testigo fue el que desarrolló la mayor altura, mientras que cuando la fertilización careció de fósforo el testigo tuvo estadísticamente ($p \leq 0.05$) la misma altura que el inóculo nativo. Finalmente, cuando se aplicó la fertilización al 100% las plantas con inóculo nativo tuvieron más altura que las plantas con *R. intraradices* y las testigo (Fig. 15b, d y f; Fig. 16d y f)

Otro patrón de crecimiento clásico fue la respuesta a la aplicación de fertilizantes, es decir las plantas con macro y micronutrientes al 100% desarrollaron mayor altura mientras que las plantas sin fertilización fueron las más pequeñas. Es posible observar lo anterior en las plantas inoculadas con *R. intraradices* o con el inóculo nativo irrigados al 45 y 85 % de CC (Fig. 15a-f).

Fue posible observar el efecto de la fertilización después de los 14 días de crecimiento en las plantas mantenidas a 85% de capacidad de campo, además, ésta diferencia en las alturas se mantuvieron durante el resto del experimento (Fig. 15a, c, e). Después de siete días de iniciar los tratamientos de irrigación (28 días), fueron visibles algunas disminuciones del crecimiento de las plantas irrigadas a 45 % de capacidad de campo (Fig. 15).

Las plantas con inóculo nativo irrigadas al 45 % de CC tuvieron un crecimiento similar a *R. intraradices* hasta el día 35 de crecimiento, posteriormente tuvo un incremento significativo en la altura de las plantas con y sin fertilización (Fig. 15a, c, e).

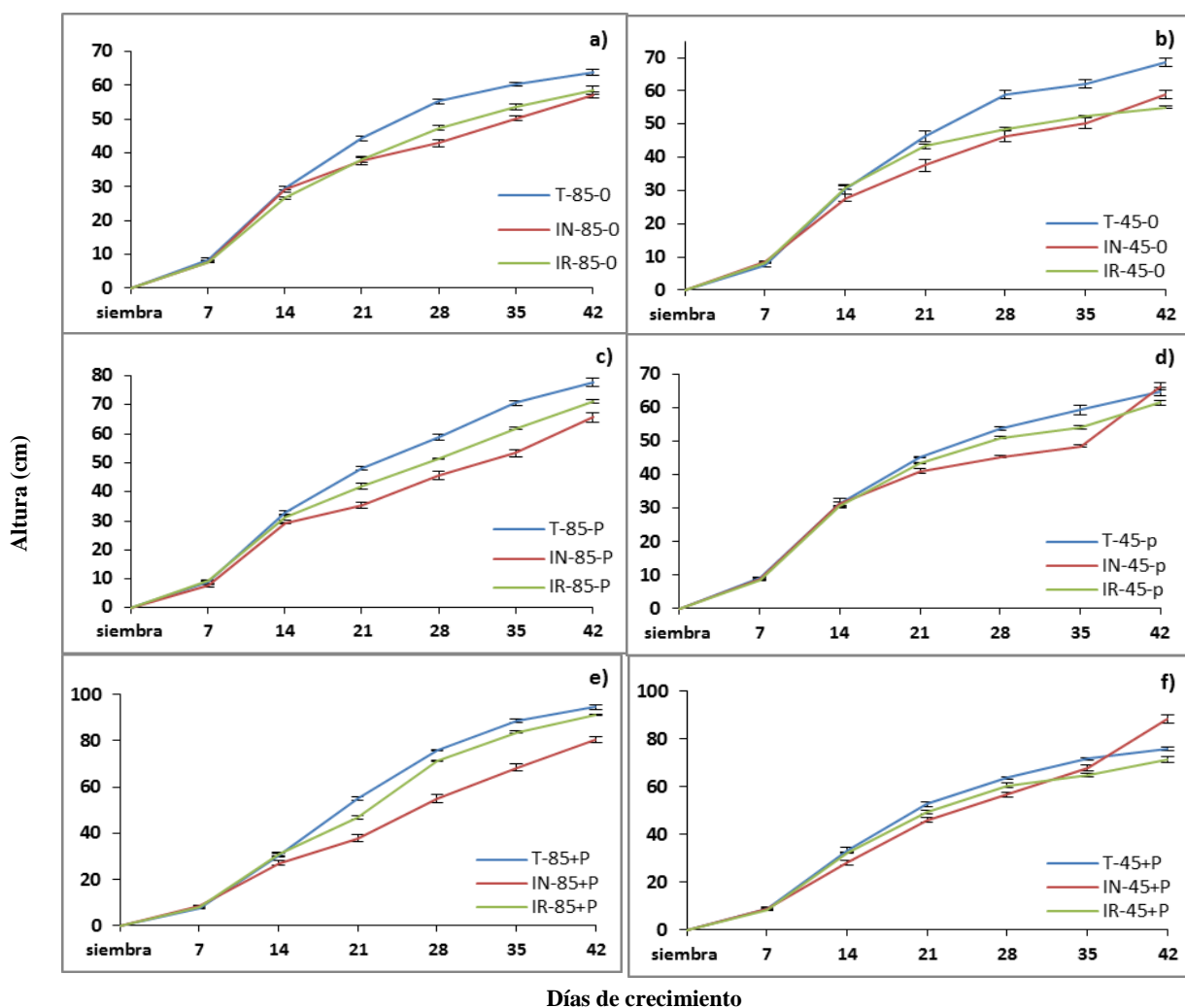


Fig. 15. Efecto de la interacción inóculo-fertilización-irrigación en la altura de plantas de maíz híbrido con y sin micorriza. Se muestran los valores promedio y su error estándar medidos cada siete días durante 42 días de crecimiento a partir de una n=5. T= testigo, IN= inóculo nativo, RI= *R. Intraradices*. a) 85% de CC sin fertilización; b) 45% de CC sin fertilización; c) 85% de CC con macro y micro nutrientes sin fósforo; d) 45% de CC con macro y micro nutrientes sin fósforo; e) 85% de CC con macro y micro al 100%; f) 45% de CC con macro y micro nutrientes al 100%.

Después de los 18 días de crecimiento, en las hojas de las plantas de algunos tratamientos se expresaron algunas tonalidades de color amarillo, verde oscuro y púrpura, lo cual sugiere síntomas de deficiencia de nutrientes. En general, las plantas sin fertilización mostraron un color amarillo en las hojas tanto en los tratamientos con 85 y 45 % de CC, lo cual podría indicar falta de nitrógeno (Fig. 16f).

Las plantas fertilizadas con macro y micronutrientes sin fósforo e irrigadas al 85 % de CC expresaron una tonalidad verde oscura y los bordes de las hojas se tornaron color púrpura (Fig. 16b). La coloración púrpura fue visible en la mayor parte de las hojas bajo la misma fertilización pero regadas a 45 % de CC (Fig. 16a). Por su parte las plantas que se fertilizaron con macro y micronutrientes al 100% con 85 y 45 % de CC no presentaron síntomas de deficiencias, es decir, tuvieron una coloración verde oscuro en toda la hoja (Fig. 16c).

Es importante mencionar que las coloraciones mencionadas son observaciones promedio hechas semanalmente a partir del día 21 después de la siembra y hasta el día de la cosecha (42 días). Sin embargo, durante los dos a tres días posteriores a la aplicación de fósforo, se observaron reducciones leves en las coloraciones púrpuras, pero nunca hasta llegar al verde normal.

En términos generales, se encontró un efecto de la irrigación sobre el contenido de prolina en las hojas de maíz de la mayoría de tratamientos; por el contrario, estadísticamente los inóculos y la fertilización no tuvieron un efecto en la acumulación de dicho aminoácido (Cuadro 9; Fig. 17).

En las plantas fertilizadas con el 100% se encontró un fuerte efecto de la irrigación con respecto a la acumulación de prolina; además, las plantas con 45 % de CC acumularon significativamente más prolina que las plantas mantenidas a 85 % de CC (Fig. 17).

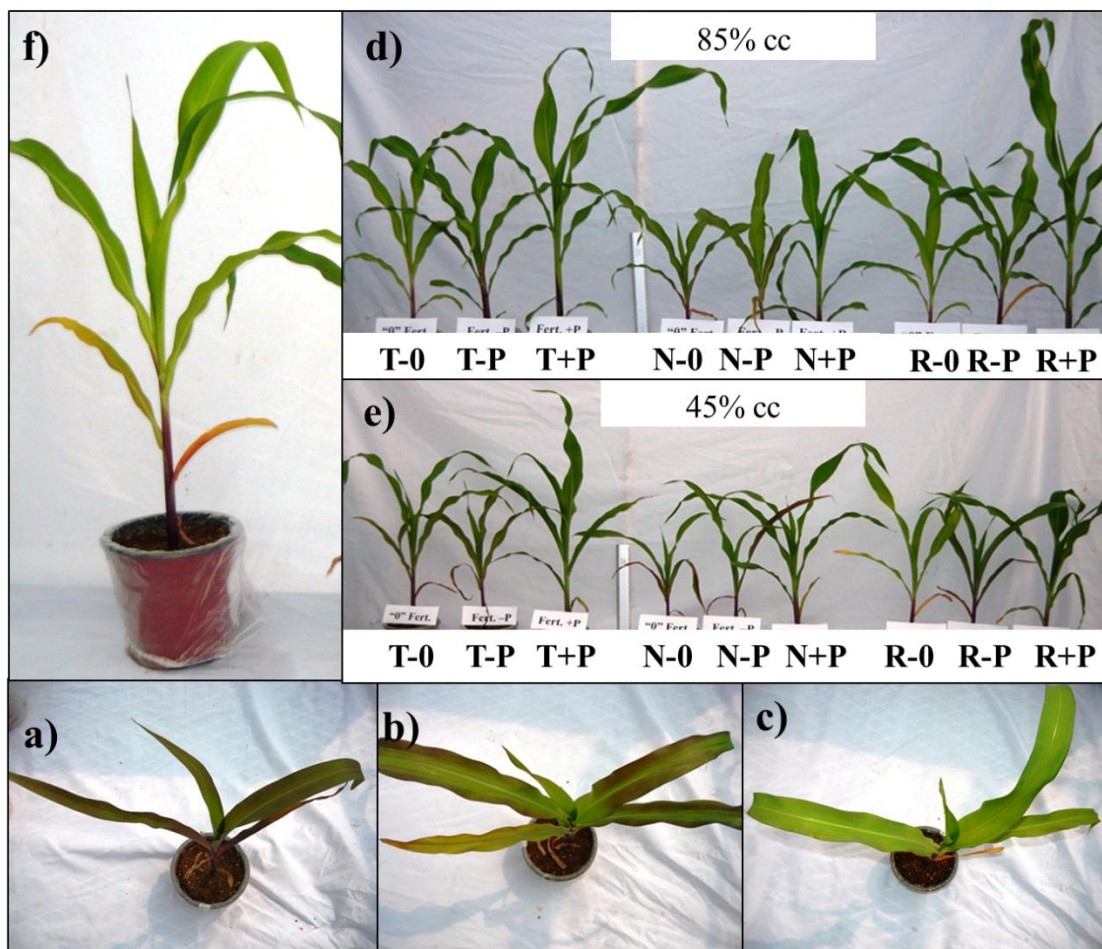


Fig. 16. Efecto de tres tratamientos de fertilización y dos niveles de irrigación sobre el desarrollo de maíz híbrido micorrizado, durante 42 días de crecimiento. a) Planta promedio con un fuerte síntoma de deficiencia de fósforo; b) Planta promedio con un mediano síntoma de deficiencia de fósforo; c) Planta promedio sin síntomas de deficiencia de fósforo a los 40 días de crecimiento; d) Desarrollo de plantas de maíz a 85% de CC; e) Desarrollo de plantas de maíz a 45% de CC. F) Planta con leve tonalidad amarilla.

En cuanto a las plantas fertilizadas con macro y micronutrientes sin fósforo solo se encontraron diferencias significativas en las plantas que no fueron inoculadas (testigo). Sin embargo, es posible observar que hay una tendencia a incrementar el contenido de prolina cuando la irrigación fue baja (45% de CC) (Fig. 17). Las plantas del inóculo nativo que no fueron fertilizadas presentaron mayor contenido de prolina con irrigación al 45 % de CC y mientras que el resto de tratamientos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 17).

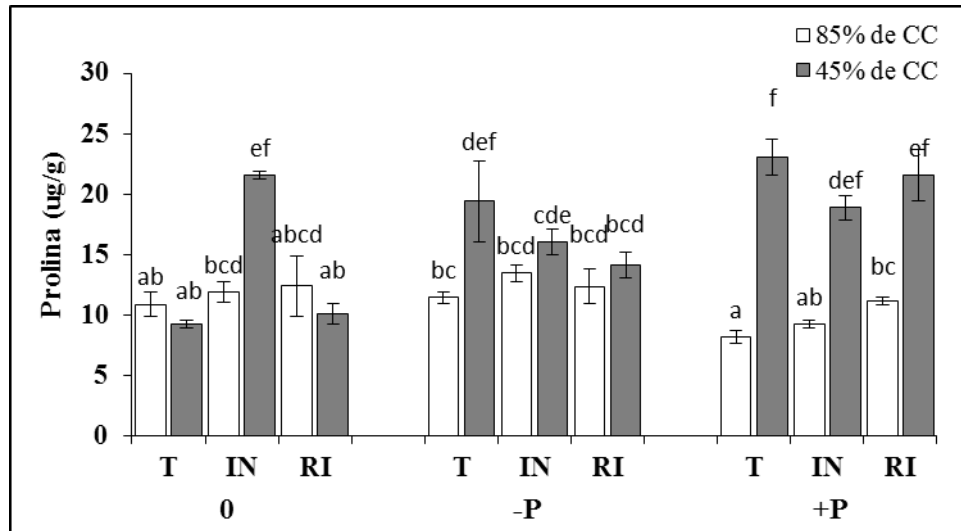


Fig. 17 . Contenido de prolina en ug/g de peso seco obtenidos de hojas de maíz híbrido con y sin micorriza bajo tres tratamientos de fertilización y dos de irrigación. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=5. Los datos fueron analizados con una prueba de LSD con $p \leq 0.05\%$. Los inóculos se muestran como: T= Testigo, IN= inóculo nativo, RI= *Rhizophagus intraradices* y los tratamientos de fertilización como: +P= Fertilización al 100%, 0= sin fertilización, -P= fertilización sin fósforo.

En ambas condiciones de irrigación, las plantas fertilizadas al 100 % tuvieron mayor acumulación de materia seca que los tratamientos con fertilización sin fósforo y sin fertilización. Además, las plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* y las testigo crecieron de manera similar, pero las plantas con inóculo nativo manifestaron reducción del peso de materia seca bajo algunas dosis de fertilización (Fig. 18).

Solo las plantas sin fertilización tuvieron el mismo peso seco aéreo ante 85 y 45 % de CC; sin embargo, las plantas inoculadas con *R. intraradices* o con el inóculo nativo tuvieron una reducción del crecimiento con respecto al testigo en ambos niveles de irrigación (Fig. 18a). Las plantas con inoculadas con inóculo nativo y con *R. intraradices* y las testigo desarrollaron más materia seca aérea entre más completa fue la dosis de fertilización bajo condiciones de riego óptimas. En contraste, cuando se irrigó al 45 % de CC solo se incrementó la biomasa en la parte aérea con la aplicación de fertilización al 100%, mientras que sin fertilización y con macro y micronutrientes sin fósforo no se encontraron diferencias significativas (Fig. 18a).

Cuando se irrigó al 85 % de CC, al igual que en la parte aérea, hubo mayor acumulación de materia seca en las raíces cuando se aplicó la dosis de fertilización al 100 %, seguido del

tratamiento fertilizado sin fósforo y las plantas que menos biomasa acumularon fueron las que no se fertilizaron. De igual modo, se observaron las disminuciones en el crecimiento de las raíces de las plantas con inóculo nativo con respecto a las testigo y con *R. intraradices* (Fig. 18b).

Las raíces de las plantas sin inóculo fertilizadas al 100 % e irrigadas al 45 % de CC tuvieron estadísticamente ($p \leq 0.05$) la misma materia seca que las raíces de las plantas con *R. intraradices* y el inóculo nativo. Cuando la fertilización careció de fósforo (-P) la materia seca de las raíces del testigo y las inoculadas con *R. intraradices* tuvieron estadísticamente la misma materia seca y a su vez, tuvieron más biomasa que las raíces con inóculo nativo. Solo cuando no se aplicó ningún fertilizante, las raíces de las plantas testigo desarrollaron significativamente ($p \leq 0.05$) mayor biomasa que las raíces de las plantas inoculadas con *R. intraradices* o con inóculo nativo (Fig. 18b). No obstante a lo anterior, las plantas testigo no presentaron efecto de ningún nivel de fertilización, es decir, tuvieron la misma materia seca bajo los tres niveles de fertilización. Por su parte, el inóculo nativo y *R. intraradices* si presentaron un efecto de la fertilización, de tal modo que desarrollaron más biomasa cuando la fertilización incluyó fósforo, mientras que tuvieron menos materia seca cuando no se aplicaron fertilizantes (Fig. 18b).

En concordancia con el análisis de varianza, el follaje y las raíces mostraron un patrón muy similar en cuanto a sus pesos secos, lo cual implica que en términos generales el desarrollo de las plantas fue limitado o promovido por los tratamientos de fertilización y la irrigación (Fig. 18; Fig. 19; Cuadro 9).

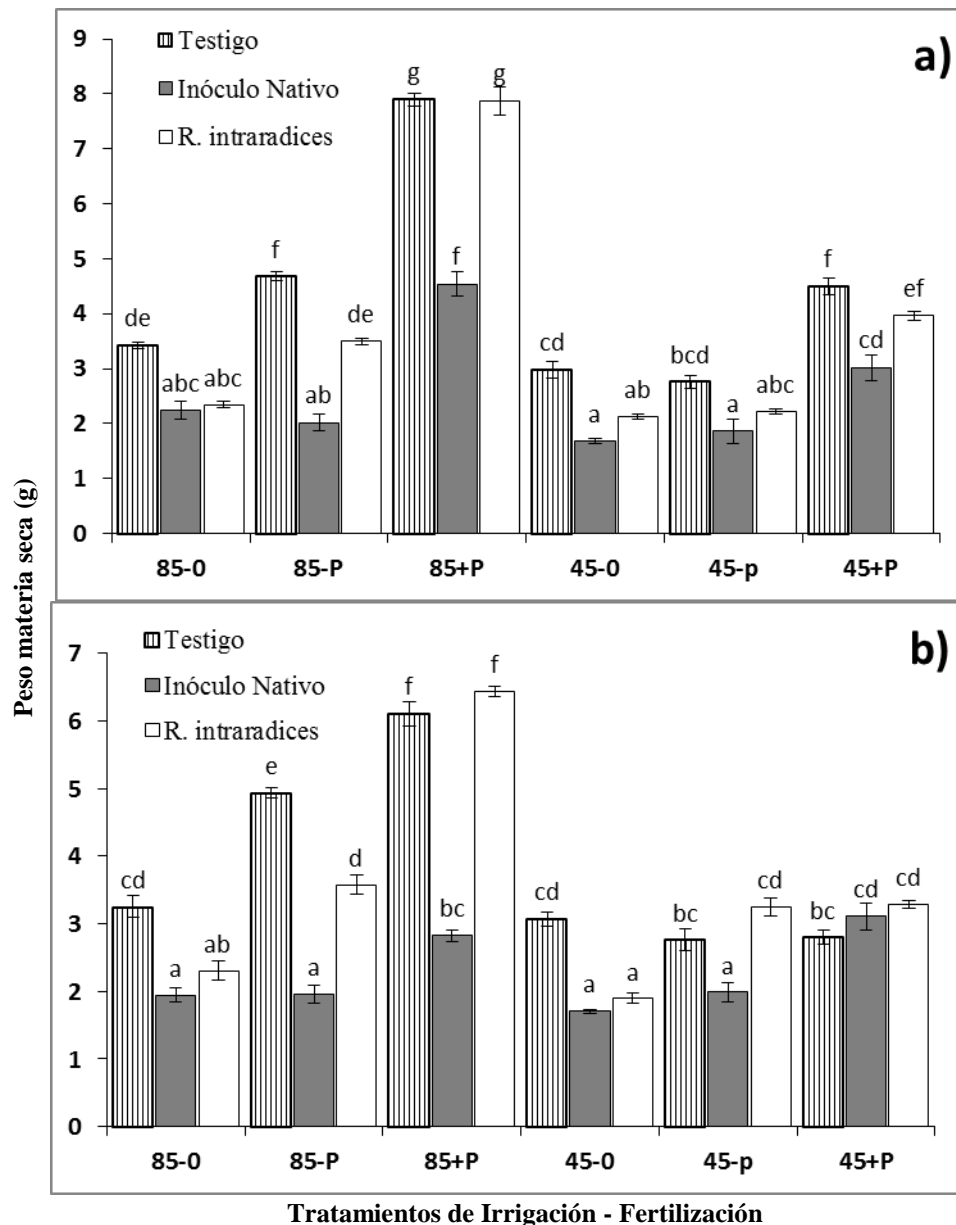


Fig. 18. Efecto de la interacción inóculo, fertilización e irrigación en el peso seco de plantas de maíz híbrido. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=5 y analizados con un test de LSD con $p \leq 0.05\%$. a) peso seco en parte aérea; b) peso seco de las raíces.

La relación alométrica entre raíz/follaje (parte aérea) de las plantas que fueron fertilizadas con macro y micronutrientes al 100 % fue mayor a uno, lo que indica que la parte aérea se desarrolló más que las raíces. Por su parte, las plantas que no fueron fertilizadas obtuvieron valores cercanos a cero. En contraste, cuando la fertilización careció de fósforo las plantas tendieron a desarrollar más raíces que parte aérea (Fig. 19).

La irrigación también tuvo un efecto en las plantas, de tal modo que las plantas con irrigación al 45 % de CC presentaron valores en la relación raíz/follaje (parte aérea) cercanos y por debajo del uno. Por el contrario, las plantas irrigadas al 85 % de CC la relación raíz/follaje (parte aérea) tuvo solo un valor por debajo del uno y el máximo fue de 1.59 cuando se aplicó la fórmula de fertilización al 100% (Fig. 19).

No parece haber un patrón claro entre la altura de la planta y el coeficiente de correlación raíz/parte aérea, dado que las plantas más pequeñas y más grandes presentaron relaciones mayores a uno (Fig. 19).

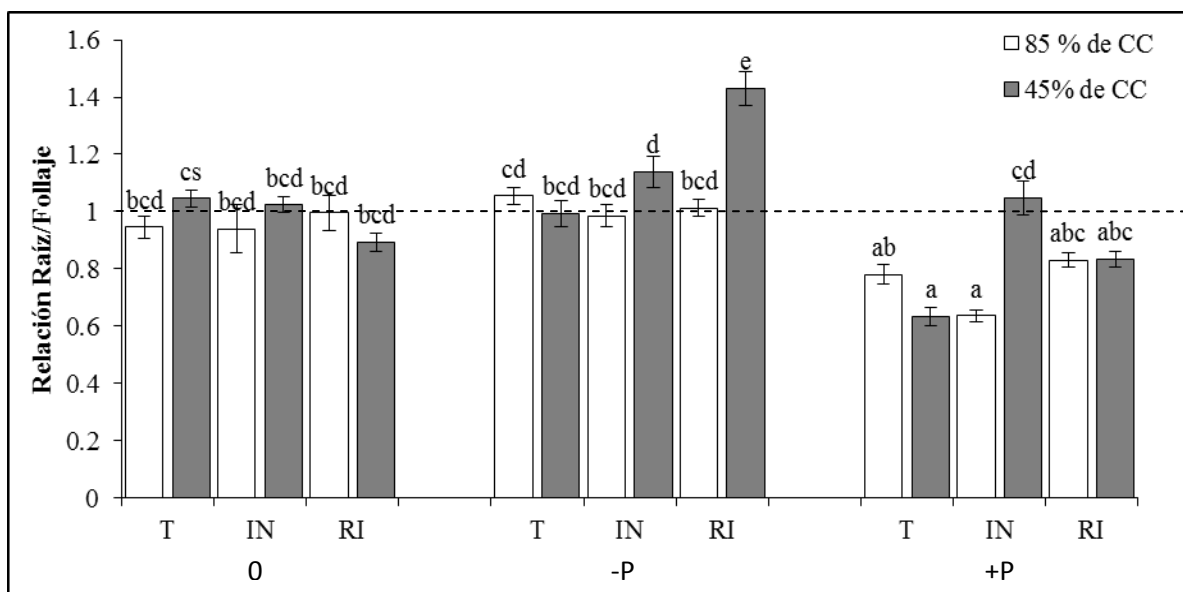


Fig. 19. Efecto de la fertilización e irrigación sobre la relación raíz/follaje (parte aérea) de plantas de maíz híbrido. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=5 y analizados con una prueba de LSD con $p \leq 0.05\%$. Los inóculo se muestra como: T= Testigo, IN= inóculo nativo, RI= *Rhizophagus intraradices* y los tratamientos de fertilización como: +P= Fertilización al 100%, 0= sin fertilización, -P= fertilización sin fósforo

En términos generales *R. intraradices* desarrolló más micelio externo, colonización total y vesículas que el inóculo nativo; además, el porcentaje de micorrización en los tratamientos con 45 % CC siempre fue menor que con el nivel de irrigación al 85 % de CC (Fig. 20).

En concordancia con el análisis de varianza, la colonización total de *R. intraradices* y el inóculo nativo fue estadísticamente similar bajo las mismas condiciones de irrigación pero la fertilización sin fósforo promovió mayor micorrización que el resto de tratamientos. Solo cuando la irrigación fue de 85 % de CC, los HMA de las plantas fertilizadas al 100% tuvieron una reducción de la colonización con respecto las fertilización sin fósforo y sin fertilización (Cuadro 9; Fig. 20a).

La mayoría de los tratamientos de irrigación y fertilización no afectaron significativamente el desarrollo de los HMA del inóculo nativo. En ese sentido solo se observó un incremento en la colonización cuando se irrigó al 85 % de CC y se aplicó fertilización sin fósforo. Dicho tratamiento también favoreció significativamente el desarrollo de *R. intraradices*, sin embargo su colonización se vio mermada cuando se fertilizó al 100% (Fig. 20a).

La fertilización y la irrigación no afectaron significativamente el desarrollo del porcentaje de vesículas del inóculo nativo. En contraste *R. intraradices* nuevamente desarrolló más vesículas en el tratamiento con fertilización sin fósforo bajo ambos niveles de irrigación; además, con 45 % de CC la colonización de dicha estructura fue estadísticamente similar a los tratamientos con fertilización 100 % y sin fertilizantes (Fig. 20b).

Cuando la irrigación se mantuvo al 85 % de CC, *R. intraradices* redujo casi el doble la colonización de arbusculos con respecto al inóculo nativo cuando la fórmula de fertilización careció de fósforo. Además, los tratamientos con fertilización sin fósforo y sin fertilización no afectaron significativamente el desarrollo de los arbusculos; sin embargo, es posible observar que *R. intraradices* obtuvo un promedio de colonización más bajo que el inóculo nativo (Fig. 20c).

Es importante notar que la presencia de arbusculos fue inversa a la colonización total y de vesículas cuando se aplicaron fertilizantes (+P y -P) y se irrigó al 85 % de CC (Fig. 20c, d). También, cuando la mayoría de las plantas estuvieron sometidas a estrés hídrico (45 % de CC) nuevamente *R. intraradices* tuvo mayor presencia de arbusculos que el inóculo nativo, pero el efecto de la irrigación y la fertilización no parece influir en el porcentaje de colonización de dicha estructura en ambos inóculos (Fig. 20c).

La fertilización y la irrigación no tuvieron efectos sobre el desarrollo del micelio externo del inóculo nativo, mientras que *R. intraradices* solo superó al inóculo nativo cuando se fertilizó sin fósforo (Fig. 20b).

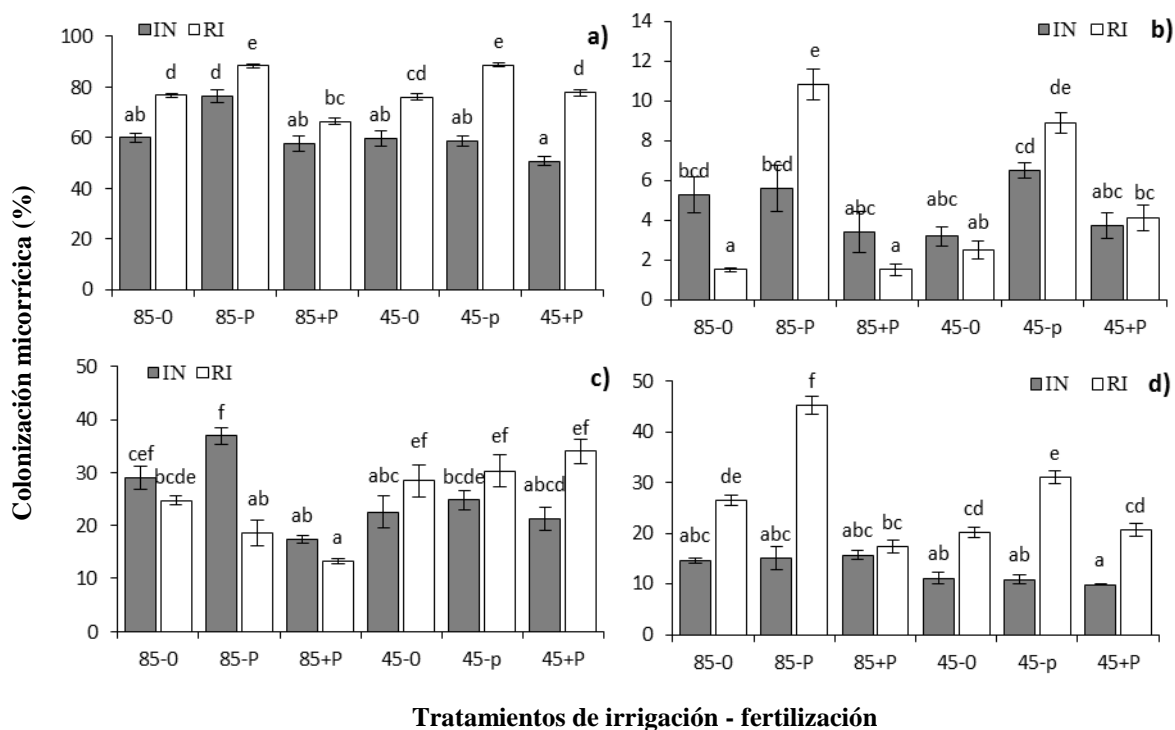


Fig. 20. Efecto de dos niveles de irrigación y tres tratamientos de fertilización mineral en la colonización micorrícica de un inóculo nativo y *Rhizophagus intraradices*. Se muestra el promedio con barras de error estándar estimados a partir de una n=5. Los datos fueron analizados con una prueba de LSD con $p \leq 0.05\%$. a) Colonización total; b) Micelio externo; c) Arbusculos; d) Vesículas. IN= inóculo Nativo; RI= *Rhizophagus intraradices*; 85= 85% de CC; 45=45% de CC. 0= sin fertilización; -P= Macro y micro elementos al 100% sin fósforo; +P=Macro y micro elementos al 100%.

En términos generales el análisis de correlación entre colonización micorrícica y el peso seco en el follaje y raíces mostraron mucha similitud con respecto a los anteriores ensayos, en los que se encontró que el inóculo nativo tuvo mayor número de correlaciones negativas mientras que en *R. intraradices* predominaron las positivas (Anexo 4).

Solo dos de las 24 correlaciones fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) y cinco más tuvieron valores de p inferiores a 0.1. Es importante mencionar que ambas correlaciones significativas fueron contrarias a la tendencia general, es decir entre mayor

fue la micorrización mayor fue la acumulación de peso seco (Fig. 21; Anexo 4). Una de las correlaciones significativas se encontró en la parte aérea de las plantas inoculadas con *R. intraradices* irrigadas con 85 % de CC y sin fertilización; la segunda fue en las raíces entre el peso seco de las raíces de las plantas con inóculo nativo irrigadas al 85 % de CC y con fertilización sin fósforo (Fig. 21; Anexo 4).

Los tratamientos del inóculo nativo con 45 y 85 % de CC sin fertilización tuvieron valores estadísticamente significativos para $p \leq 0.1$, además, presentaron una correlación negativa entre micorrización y peso seco en ambas partes de la planta y un coeficiente de correlación mayor al 65%. En contraste, el tratamiento del inóculo nativo irrigado al 85% de CC y con fertilización sin fósforo desarrolló estadísticamente el mayor porcentaje de micorrización, además, también mostró una relación peso seco-colonización positiva ($p = 0.093$ y 0.01 para follaje y raíces, respectivamente) (Anexo 4).

Por su parte *R. intraradices* irrigado al 85 % de CC sin fertilización tuvo una relación positiva altamente significativa ($p \leq 0.01$ y $R^2 = 93.7\%$) entre micorrización y peso seco; por el contrario, el tratamiento con 45% de CC y fertilización al 100% obtuvo un relación negativa ($p \leq 0.1$ y $R^2 = 68\%$). Hay que resaltar la correlación negativa también tuvo el porcentaje de micorrización más bajo (77.8%) con respecto al promedio general (80.6%) considerando de los tres tratamientos de fertilización a 45 % de CC (Anexo 4).

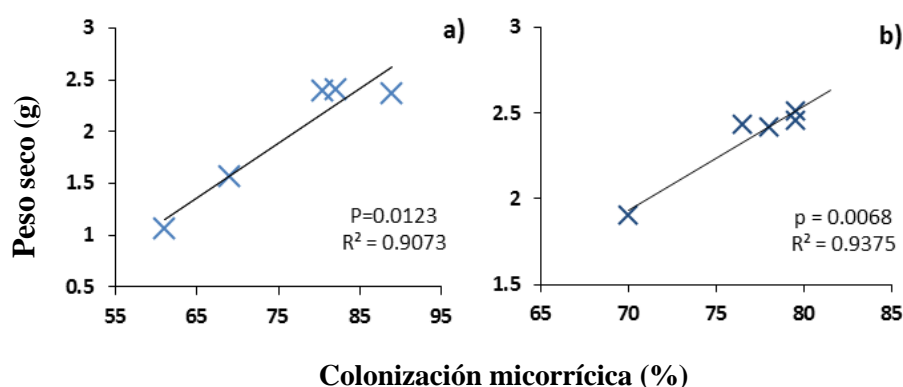


Fig. 21. Análisis de correlación entre el porcentaje de colonización total y el peso seco parte aérea. Se muestra en a) Correlación entre el peso seco de las raíces con inóculo nativo irrigadas al 85 % de CC y con fertilización sin fósforo; en b) Correlación entre el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con *R. intraradices* irrigadas al 85 % de CC y sin fertilización.

5. DISCUSIÓN

La presente investigación evaluó el efecto individual y combinado de la fertilización mineral e irrigación sobre el desarrollo del maíz híbrido y la colonización micorrícica, así como la interacción entre el porcentaje de los HMA y el desempeño vegetal del maíz. En general, se encontró que entre mejores son las condiciones de crecimiento hay una tendencia a incrementar el desarrollo de la de plantas de maíz híbrido NB9. Por su parte, el desarrollo de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) se incrementa cuando hay poca irrigación y la fertilización carece de fósforo. En la presente sección se discute por separado los efectos de la fertilización mineral y la irrigación en el desarrollo de maíz y la colonización micorrícica y finalmente se aborda la combinación de los factores.

Efecto de la irrigación sobre el desempeño vegetal del maíz

Se encontró un efecto significativo de la irrigación sobre el desarrollo vegetativo del maíz. Se observó en las plantas sometidas a sequía (45 % de CC) algunas de las respuestas fisiológicas como el enrollamiento de las hojas, la disminución de la biomasa, senescencia de las hojas y síntesis de prolina (Taíz y Zeiger, 2006; Ghannoum, 2009).

La prolina es un aminoácido que puede ser utilizado como indicador de la presencia de estrés hídrico en las plantas, dado que entre otras funciones puede participar como un regulador osmótico (Ashraf y Foolad, 2007). Si bien el contenido de prolina solo se midió en el experimento tres y se encontró mayor prolina en la mayoría de tratamientos a 45 % de CC, es posible inferir que las plantas del primer experimento bajo la misma irrigación también desarrollaron estrés hídrico, ya que si bien, no se midieron atributos fisiológicos, las hojas mostraron los síntomas clásicos de estrés hídrico como disminución de la biomasa, enrollamiento y senescencia de las hojas (Fig. 6; Fig. 7) (Taíz y Zeiger, 2006; Ghannoum, 2009).

Ruiz-Lozano *et al.*, (1995) reportaron que varias especies, entre ellas *Glomus intraradices* (ahora *Rhizophagus intraradices*), tuvieron un efecto significativo en la reducción de estrés hídrico medido en términos de acumulación de biomasa y contenido de prolina en plantas

de lechuga, aunque determinaron que *G. deserticola* fue la especie con mayor capacidad para reducir el estrés hídrico en términos fisiológico. Feng *et al.*, (2002) reportaron que *Glomus mosseae*, puede incrementar la concentración de azúcares en las raíces como respuesta a estrés salino en plantas de maíz, dicha acumulación podría servir para mantener la asociación micorrícica y como un regulador osmótico de las raíces.

Es clara la tendencia a incrementar el contenido de prolina en las hojas de las plantas con irrigaciones bajas y con la fertilización con fósforo, mientras que algunos tratamientos sin fertilización y con fertilización sin fósforo irrigadas al 45 % de CC no siempre sintetizaron más prolina que las plantas con irrigación al 85 % de CC. La biosíntesis de la prolina depende de la fosforilación del glutamato y diversas relaciones en el cloroplasto, citosol y mitocondria que requieren energía expresada en ATP, por lo tanto, el fósforo aplicado en la fertilización podría compensar de la necesidad de fósforo para la síntesis de ATP y a su vez éste estar disponible para la síntesis de prolina (Lehmann, 2010). Lo anterior refuerza la hipótesis que cuando el fósforo es limitado la planta no sintetice prolina para reducir el gasto energético, por lo que otros osmoreguladores como la trehalosa, podría ser otro indicador funcional de la presencia de estrés hídrico en futuras investigaciones donde no se aplique fertilización (Pilon-Smits *et al.*, 1998). No obstante, es importante considerar que el fósforo es un macronutriente poco móvil y su disponibilidad depende de la concentración del calcio, aluminio o hierro, pH del suelo, la humedad del suelo y de su textura (Porta *et al.*, 2003). Lo anterior sugiere que las coloraciones moradas en las hojas de las plantas irrigadas al 45 % de CC tuvieron deficiencia de fósforo, aun cuando las plantas fueron micorrizadas, lo cual refuerza la hipótesis planteada de que la disponibilidad de fósforo es importante para la síntesis de prolina.

Efecto de la fertilización sobre el desempeño vegetal del maíz

La aplicación de fertilización en los sistemas de producción de maíz es una práctica agrícola común para incrementar la productividad del cultivo (Mapes y Mera 2009). En éste trabajo se comprobó que las plantas fertilizadas tuvieron mayor ganancia de peso seco, mayor vigor durante el desarrollo y una coloración verde homogénea de las hojas con respecto a las plantas que no fueron fertilizadas. En el experimento dos y tres la

fertilización los tratamientos de fertilización redujeron los síntomas de deficiencia de fósforo (coloración morada en las hojas; Fig. 7, Fig. 13, Fig. 16) observadas en el experimento uno; los síntomas disminuyeron incluso en los tratamientos con macro y micro nutrientes sin fósforo. Lo anterior podría ser explicado debido a que la aplicación de CaCl_2 y micronutrientes pudieron neutralizar el pH y por ende solubilizar el fósforo del sustrato a través del intercambio catiónico. El incremento de los cationes de la fórmula de fertilización (Ca^{++} , Mg^{++} y Na^+) pueden intercambiarse con los cationes del fósforo y por tanto incrementar la disponibilidad de fosfatos para la planta (Porta *et al.*, 2003).

En el experimento integral se observó claramente el fenómeno de “la ley del mínimo” de Liebig (Garate y Bonilla, 2008); encontrándose que las plantas a las que se les aplicó la dosis de fertilización al 100 % fueron las que acumularon la mayor materia seca, seguidas de las plantas con fertilización sin fuente de fósforo y finalmente, las plantas que acumularon menos biomasa fueron las que no se fertilizaron (Garate y Bonilla 2008). Además las deficiencias de fósforo en las plantas fueron más notorias cuando se aplicó fertilización sin fósforo, lo que sugiere que el desarrollo de las plantas estuvo limitado por la disponibilidad de dicho elemento.

Diversidad de hongos micorrícicos del inóculo nativo

En el inóculo nativo se identificaron 18 morfotipos que fueron clasificados en cuatro géneros *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*, e *Intraespora* y de ellos los más diversos fueron *Acaulospora* y *Glomus*. Es importante considerar que cada morfotipo no necesariamente corresponde a una especie, puesto que se han reportado que en los agroecosistemas de México hay una diversidad de 21 especies agrupados en 10 géneros de los cuales *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* son los más diversos (Montaño *et al.*, 2012).

La baja diversidad de géneros de HMA encontrados en el inóculo nativo podría ser explicada por las prácticas de manejo agrícolas donde se colectó el inóculo, dado que la parcela normalmente es empleada para la producción e investigación de maíz convencional con aplicación de insumos de moderados a fuertes (Jansa *et al.*, 2003; Ohel *et al.*, 2003; Ohel *et al.*, 2004). Una de las prácticas agrícolas que tiene el mayor impacto sobre la diversidad de HMA es la eliminación de las hierbas (Ramos-Zapata *et la.*, 2012), en ese

sentido, la agricultura orgánica permite y fomenta la tolerancia es arvenses como práctica cultural, lo cual tiene un beneficio en la diversidad de HMA nativos (Ryan y Tibbett 2008).

Interacción de la colonización micorrícica con el desempeño vegetal

Existen numerosos estudios que demuestran efectos benéficos de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) sobre el control de enfermedades, en la mejora de condiciones fisiológicas de las plantas bajo condiciones de estrés, en el incremento del rendimiento, entre otros beneficios (Amerian, 2001; Ruiz-Lozano, 2004; Smith *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 2008). Las tres fases experimentales se observó que los hongos micorrícicos pueden disminuir el crecimiento de las plantas de maíz como lo demuestran los resultados de la relación raíz/follaje (parte aérea) en condiciones de sequía y algunos con irrigación abundante. Además se encontró que el inóculo puede potencialmente reducir la biomasa durante las primeras seis semanas del desarrollo de las plantas. La reducción de la biomasa de las plantas con el inóculo nativo no implica necesariamente un efecto perjudicial considerando que las plantas no solo interactúan con los HMA, sino con toda la diversidad de microorganismos como patógenos, bacterias y hongos promotores del crecimiento y agentes de control biológicos (Raaijmakers *et al.*, 2009). Por otro lado, todos los experimentos se realizaron en 42 días equivalentes a un cuarto del ciclo de vida de las plantas (180 días), lo cual no implica necesariamente que la reducción de la biomasa tenga un impacto directo en el rendimiento total y calidad del grano.

Existen algunos reportes donde se muestra que los HMA no necesariamente estimulan el desarrollo de las plantas, por lo que el efecto de los hongos micorrícicos depende en gran medida tanto de la cepa o consorcio de hongos utilizados, sus hospederos, la interacción con el ambiente y la compatibilidad funcional entre los HMA y las plantas (Gavito y Varela, 1995; Munkvold *et al.*, 2004; van der Heijden *et al.*, 2004). Mickelson y Kaeppler (2005) sugirieron que el efecto de los HMA puede variar incluso entre cepas de la misma especie y no tanto del tipo de variedad de maíz o del porcentaje de colonización micorrícica.

Una relación mutualista entre las plantas y los HMA deben tener un beneficio mutuo o al menos no debe existir un desbalance entre las necesidades de los HMA y la capacidad

productiva de las plantas, lo contrario implicaría un cambio en la relación ecológica de mutualismo a parasitismo (Johnson *et al.*, 1997; Heinz *et al.*, 2006). Con frecuencia el establecimiento de la simbiosis micorrícica implica que los HMA absorban carbono y no suministren a su hospedero recursos mientras se desarrolla el micelio externo. Además, la cantidad de carbono requerido así como el tiempo de absorción depende de cada especie de hongo y/o cepa así como de la compatibilidad y resistencia genética de la planta al establecimiento de la micorriza (Lerat *et al.*, 2003; Heinz *et al.*, 2006). Para considerar que una relación entre HMA estudiados y las plantas es parásita o mutualista sería necesario considerar un contexto más holístico, en el que se evalúe no solo la ganancia o reducción de la biomasa, sino de más elementos fisiológicos, en la salud de las plantas, calidad de los frutos de las plantas y la capacidad productiva en términos del fruto o propágulos de los HMA.

Es importante considerar que la mayoría de los estudios se han realizado con cepas de hongos seleccionadas, aisladas y caracterizadas, lo cual podría no reflejar las funciones que la diversidad de HMA del suelo realizan y por ende, los efectos reportados en la literatura pueden diferir en los agroecosistemas. Por otro lado, la mayoría de los experimentos se han realizado bajo condiciones experimentales controladas tanto para los hongos como para sus hospederos, es decir, en cámaras de crecimiento o invernaderos con control de la temperatura, fotoperiodo, humedad relativa, riegos, además de limitar el acceso de microorganismos antagónicos. Lo anterior permite un entendimiento general de papel de los HMA y en base es posible escalar las fronteras de investigación a condiciones de campo que permitan mejorar e implementar las técnicas de mejor del suelo y la diversidad de HMA nativos, de cepas de investigación o cepas comerciales que incrementen la sustentabilidad de los agroecosistemas (Raaijmakers *et al.*, 2009; Gianinazzi *et al.*, 2010)

Efecto de la irrigación sobre el desarrollo de HMA

Auge (2000) en su revisión sobre el comportamiento de los estomas entre plantas micorrizadas mencionó que el beneficio de los HMA puede ser variable e incluso las asociaciones micorrícicas pueden tener un efecto negativo en el crecimiento de las plantas. La acumulación de prolina en la hoja bandera de las plantas micorrizadas y no micorrizadas

fue muy similar habiendo fuertes diferencias solo en el las plantas con inóculo nativo bajo estrés hídrico y hay disponibilidad de fósforo. Lo anterior es consistente con lo encontrado por Ruíz-Lozano (2004), quien reportó mayor acumulación de prolina en plantas de soya (*Glycinemax*) micorrizadas bajo estrés hídrico, pero con menor concordancia con Pinior *et al.* (2005) quienes concluyeron que en plantas de rosa (*Rosa hybrida* L.) la acumulación de prolina dependió de la irrigación y no de la inoculación de HMA. Es probable que las comunidades de HMA del inóculo nativo en el tratamiento con estrés hídrico (45 % de CC) y con fertilización fosforada hayan suministrado a la plantas algunas cantidades de fósforo y otros nutrientes que permiten hacer el gasto energético de ATP para la biosíntesis de prolina (Lehmann, 2012).

Se ha observado en plantas de maíz inoculado con *Glomus intraradices*, *G. mosseae* y *G. etunicatum* un incremento de la colonización micorrícica como respuesta a estrés hídrico (Subramanian *et al.*, 1995; Boomsma y Vyn, 2008). En contraste, se ha reportado un bajo porcentaje de colonización micorrícica en algunas especies como *Genista hirsuta* o *Triticum* cultivadas bajo sequía, mientras que para *Lens esculenta* y *Vicia faba* se registró un incremento de la colonización (Auge, 2001). Lo anterior sugiere que la colonización depende en gran medida también de otros factores como la disponibilidad de fósforo.

Efecto de la fertilización sobre la colonización micorrícica

La ausencia de contrastes entre los diferentes tratamientos de fósforo sobre la colonización micorrícica en el experimento dos puede ser explicado por el contenido de arcillas y fósforo de suelo (Anexo 1), sin embargo, la aplicación de calcio y micronutrientes pueden incrementar la solubilización de fósforo en suelos arcillosos a través del intercambio catiónico, haciendo disponible cantidades limitadas pero constantes de fósforo (Porta *et al.*, 2003).

La disponibilidad de fósforo en el suelo es uno de los principales minerales que limitan o promueven la colonización micorrícica (Jakobsen *et al.*, 1992; Smith y Read, 2008), lo cual es consistente con los resultados del experimento tres en el que se encontró que la fertilización afectó significativamente la colonización de HMA; incrementándose en la

fertilización sin fósforo y con menor porcentaje cuando se aplicaron fosfatos. Se ha reportado que variedades de maíz poco eficientes en el uso de fósforo y nitrógeno, como la mayoría de variedades híbridas, establecen mayor simbiosis con los HMA para mejorar su eficiencia en el uso de dichos minerales (Montaño *et al.*, 2001). Las asociaciones micorrícicas permiten a las plantas incrementar la absorción de fósforo, por lo que el incremento en la colonización micorrícica en las plantas sin fertilización es una respuesta para compensar la falta de fósforo en el crecimiento de las plantas sin comprometer su desarrollo (Clark y Zeto, 2000).

Interacción de la fertilización y la irrigación sobre el desarrollo del maíz híbrido micorrizado

Se encontró una relación inversa entre la irrigación y la micorrización pero positiva con la acumulación de materia seca de las plantas, es decir, entre mayor fue la irrigación menor fue la colonización micorrícica y entre menor fue la irrigación menor fue la producción de biomasa seca en raíces y parte aérea. Las plantas inoculadas y no inoculadas desarrollaron más biomasa cuando se fertilizó al 100 % y se irrigó al 85 % de CC, lo cual concuerda con el patrón clásico de crecimiento de las plantas que no tienen limitación de recursos (Taiz y Zeiger, 2006; Garate y Bonilla, 2008). Cuando se fertilizó al 100% y se irrigó al 45 % de CC se observó que las plantas inoculadas y no inoculadas tuvieron estadísticamente la misma materia seca. Lo anterior sugiere que bajo éstas condiciones, los HMA pueden estar funcionando como amortiguadores del estrés considerando que con 45 % de irrigación se obtuvieron los mayores porcentajes de colonización (Osonub, 1994; Ghannoum, 2009).

Los resultados en colonización micorrícica lo cual sugiere al momento de la cosecha (42 días después de la siembra), la mayoría de la colonización de *R. intraradices* se encontró acumulando carbohidratos en las vesículas y por ende terminado su ciclo de vida (McGonigle, 1978; Smith y Read, 2008). Por su parte, la diversidad de hongos del inóculo nativo permitió mantener la funcionalidad de la simbiosis micorrícica por mayor tiempo, ya que la actividad de algunas especies de hongos pueden tener tiempos funcionales y de vida diferentes lo que le permitiría prolongar más tiempo su funcionalidad expresada en términos de presencia de arbusculos (McGonigle, 1978). Los resultados concuerdan con

Gavito y Varela (1995) quienes evaluaron el efecto de diferentes aplicaciones de fósforo en maíz criollo, dos aislados puros de HMA (*Acaulospora bireticulata* y *Glomus mosseae*) y una población nativa con 14 especies. Encontraron que bajo algunas concentraciones de fósforo las poblaciones nativas producen una cantidad de biomasa similar o incluso menor a los aislados.

Se ha observado que cuando la humedad del suelo y el contenido de fósforo son bajos, la colonización micorrícica puede incrementarse (Auge, 2003). En contraste, Bolgiano *et al.* (1983) dan prioridad al déficit de fósforo como promotor de la colonización micorrícica mientras que coloca a la irrigación como segundo factor, con lo cual los presentes resultados concuerdan parcialmente, dado que el porcentaje de colonización micorrícica, las vesículas y el micelio externo se favorecen cuando hay déficit de fósforo, pero la colonización de arbusculos en *R. intraradices* se vio reducida bajo las mismas condiciones. Cuando la irrigación fue al 45 % de CC la colonización de arbusculos no presentó efecto de fertilización.

Correlaciones entre nivel de la colonización con HMA en raíces y desempeño vegetal en maíz.

En general, *R. intraradices* tuvo mayor capacidad infectiva que el inóculo nativo, además las pocas relaciones estadísticamente significativas mostraron que el efecto de *R. intraradices* podría darse a costa de colonizar al menos el 75 % de las raíces que pueden ser micorrizadas. Aunado a lo anterior, algunos porcentajes de colonización del inóculo nativo fueron muy cercanos al 75 % y también presentaron interacción positiva, por el contrario porcentajes inferiores al 75 % de colonización muestran tendencias a reducir la biomasa de las plantas con inóculo nativo y como con *R. intraradices*. Lo anterior podría sugerir que un incremento en la colonización micorrícica promovería una asociación positiva entre los hongos micorrícicos arbusculares y el maíz híbrido y con ello probablemente se compensaría la reducción del crecimiento observado en las plantas inoculadas. Montañón (2001), reportó que colonizaciones del 75% para el maíz y 71% para el trigo podrían compensar la baja eficiencia del uso de fósforo y nitrógeno e incluso mejorar la producción total de biomasa, el rendimiento (semilla) y acumulación de N y P.

Como se mencionó, hacer una apreciación objetiva del beneficio o perjuicio de los HMA sobre el cultivo de maíz debe ser necesariamente con base a una amplia reflexión acerca de todas las funciones ecológicas que realizan las micorrizas. Considerando no solo en la incremento de la biomasa o productividad como paradigma único, sino también en la compleja red de interacciones rizosféricas que se establecen en los agroecosistemas así como en sus contribuciones al mantenimiento de los suelos (Gianinazzi *et al.*, 2010).

La promoción de porcentajes altos de micorrización en los campos de cultivo no solo pueden alcanzarse a través de la inoculación de HMA exógenos, sino también de aplicación de prácticas culturales adecuadas que favorezcan las condiciones para mantener la diversidad de HMA nativos adaptados a los sitios de producción, en pocas palabras, un manejo adecuado de los suelos y su biodiversidad (Lambert *et al.*, 1980).

6. CONCLUSIONES

El efecto combinado e individual de la fertilización y la irrigación tienen impactos inversos en el desarrollo de las comunidades de HMA y las plantas de maíz híbrido cultivadas en invernadero. La baja irrigación, que también promueve estrés hídrico, en combinación con fertilización sin fósforo favorece la colonización micorrícica, pero merman el desarrollo del maíz. Por el contrario, la irrigación abundante en combinación con fertilización completa promueve el desarrollo de maíz mientras que la colonización micorrícica se reduce al no tener necesidad de asignar recursos para mantener la simbiosis.

La irrigación fue el factor principal de respuesta de las plantas, seguido de la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, se encontró un patrón consistente en el efecto combinado de la fertilización y la irrigación sobre el desarrollo de los hongos micorrícicos.

No fue posible establecer un patrón contundente entre la micorrización y la producción de materia seca.

Las reducciones del crecimiento observadas en el inóculo nativo y *R. intraradices* no necesariamente implican que las interacciones micorrícicas sean de tipo parasítica durante cierta parte del ciclo de vida de los hongos y el maíz. Las asociaciones micorrícicas podrían compensar otras funciones de la plantas como la protección contra patógenos, la eficiencia del uso de nutrientes o mejorando procesos fisiológicos bajo condiciones de estrés hídrico o falta de nutrientes.

El contenido de prolina en la hoja bandera de las plantas fue un indicador de estrés hídrico adecuado y se encontró una fuerte relación con la irrigación y la aplicación de fósforo en plantas micorrizadas y no micorrizadas.

Se acepta la hipótesis planteada, por lo que la interacción de la irrigación y la fertilización sí afectan el desarrollo del maíz híbrido y los HMA. A mayor disponibilidad de riego y fertilización mineral con fósforo mejoran el desempeño vegetal del maíz y pero la colonización de HMA se reduce.

7. EXPECTATIVAS Y LIMITACIONES

Es necesario mejorar la técnica de aplicación de fertilizantes, de tal modo que antes de la siembra el sustrato contenga todos los minerales.

Es necesario evaluar el efecto de la fertilización y la irrigación con plantas micorrizadas y no micorrizadas pero hasta la obtención de elote, así mismo evaluar la calidad del fruto para tener una perspectiva más amplia del papel de las micorrizas sobre el desarrollo del maíz.

El presente trabajo da por hecho que las plantas de la fase donde se evaluó el efecto de la irrigación (primera fase) desarrollaron estrés hídrico, sin embargo no se midieron atributos fisiológicos que den certeza del estado de las plantas.

Si bien, no es objetivo de la presente investigación conocer la diversidad de los HMA del inóculo nativo, es necesario ampliar el conocimiento de morfotipos a especies, para poder hacer posibles atribuciones por grupo taxonómico.

Realizar mediciones específicas de la cantidad de fósforo y nitrógeno en el tejido vegetal podrían ampliar la discusión en torno a la funcionalidad de los HMA como mejoradores de la nutrición vegetal bajo diferentes niveles de irrigación y fertilización mineral.

8. LITERATURA CITADA

- Alabouvette C., Olivain C., Migheli Q., Steinberg C. 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* (184):529-544.
- Amerian M. R., Stewart W. S., Griffiths H. 2001. Effect of two species of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, assimilation and leaf water relations in maize (*Zea mays*). *Annals of Applied Biology* (63):1-6.
- Ashraf M., Foolad M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* (59):206-216.
- Augé R. M. 2000. Stomatal behavior of arbuscularmycorrhizal plants. In: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function* 201-237p.
- Augé R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* (11):3-42.
- Augé R. M. 2003. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science* (84):373-381.
- Azcón-Aguilar C., Barea J. M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens, an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* (6):457-464.
- Bates L., Waldren R. P., Teare I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* (39):205-207.
- Bolan N. S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134(2):189-207.
- Bolgiano N. C., Safir G. R., Warnacke D. D. 1983. Mycorrhizal infection and growth of onion in the field in relation to phosphorus and water availability. *Journal of the American Society for Horticultural Science* (108):819-825.
- Boomsma C. R., Vyn T. J. 2008. Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Field Crops Research* (108):14-31.
- Braunberger P. G., Millers M. H., Petersonr L. 1991. Effect of phosphorus nutrition on morphological characteristics of vesicular arbuscular mycorrhizal colonization of maize. *New Phytologist* (119):107-113.
- Brundrett M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* (154):275-304.
- Brundrett M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* (320):37-77.
- Bucher M. 2006. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173(1):11-26.

- Cho K., Toler H., Lee J., Ownley B., Stutz J. C., Moore J. L., Augé R. M. 2006. Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology* (163):517-528.
- Clark R. B., Zeto S. K., 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* 23(7):867-902.
- Comisión Nacional del Agua. 2011. Estadísticas del agua en México, edición 2011. Disponible en: <ftp://ftp.conagua.gob.mx/SISI1610100092412/Estadisticas%20de%20los%20Distritos%20de%20Riego/2009-2010/Estad%EDsticas%20Agr%EDcolas%20DR%202009-2010.pdf>
- Dearnaley D. W. J. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17(6):475-486.
- Doubnerová V., Ryslavá H. 2011. What can enzymes of C4 photosynthesis do for CO2 plants under stress? *Plant Science* (180):575-583.
- Fan L. M., Zhao Z., Assmann S. M. 2004. Guard cells: a dynamic signaling model. *Current Opinion in Plant Biology* (7):537-546.
- Feng G., Zhang F., Li X., Tian C., Tang C., Rengel Z. 2002. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* 12(4):185-190
- Ferrera-Cerrato R., Alarcón A. 2007. Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Ed. Trillas. México D. F. 568 p.
- Garate A., Bonilla I. 2008. Nutrición mineral y producción vegetal. En: Azcón-Bieto J., Talón M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2a ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid 143-164 p.
- Gavito M. E., Varela L. 1995. Response of 'criollo' maize to single and mixed species inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* (176):101-105.
- Ghannoum O. 2009. C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany* (103):635-644.
- Gianinazzi S., Gollotte A., Marie-Noëlle B., Diederik van T., Redecker D., Wipf D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20(8):519-530.
- Gianinazzi S., Vosátka M. 2004. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Canadian Journal of Botany* 82(8):1264-1271.
- Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. 1978. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiological Plant Pathology* 12(1):45-53.
- Gliessman S. R. 2002. *Agroecología: Procesos ecológicos en la agricultura sostenible*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba. Costa Rica. 359 p.

- Gryndler M., Larsen J., Hršelová H., Řezáčová V., Gryndlerová H., Kubát J. 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16(3):159-166.
- Heinz K. K., Franken P., Hüchelhoven R. 2006. Endophyte or parasite-what decides?. *Current Opinion in Plant Biology* (9):358-363.
- Ibarra-Caballero J., Villanueva-Verduzco C., Molina-Galán J. M., Sánchez-De-Jiménez E. 1987. Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: a tissue differentiation requirement. *Journal of Experimental Botany* (39):889-897.
- Ilahi I., Dörffling K. 1982. Changes in abscisic acid and proline levels in maize varieties of different drought resistance. *Physiologia Plantarum* 55(2):129-135.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2007. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/agro/ca2007/resultados_agricola/default.aspx
- Jakobsen I., Abbott L. K., Robson A. D. 1992. External hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. hyphal transport of ³²P over defined distances. *New Phytologist* (120):509-516.
- Jansa J., Mozafar A., Kuhn G., Anken T., Ruh R., Sanders I. R., Frossard E. 2003. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecological Applications* (13):1164-1176.
- Johnson C. N. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist* (185):631-647.
- Johnson N. C., Graham J. H., Smith F. A. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* (135):575-585.
- Jugenheimer R. W. 1988. Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa. México D. F. 841p.
- Klironomos N. J., Hart M. M. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* (12):181-184.
- Lambert D. H., Cole H., Baker D. E. 1980 Adaptation of vesicular arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytologist* (85):513-520.
- Larsen J., Graham J., Cubero J., Ravnskov S. 2011. Biocontrol traits of plants growth suppressive arbuscular mycorrhizal fungi against root rot in tomato caused by *Pythium phanidermatum*. *European Journal of Plant Pathology* (133):361-369.
- Larsen J., Ravnskov S., Jakobsen I. 2003. Combined effect of an arbuscular mycorrhizal fungus and biocontrol bacterium against *Pythium ultimum* in soil. *Folia Geobotanica* (38):145-154.
- Lawlor D. W. 2002. Limitation to Photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* (89):871-885.

- Lehmann S., Funck D., Szabados L., Rentsch D. 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39(4):949-962.
- Lerat S., Lapointe L., Piché Y., Vierheilig H. 2003. Variable carbon-sink strength of different *Glomus mosseae* strains colonizing barley roots. *Canadian Journal Botany* (81):886-889.
- Leszeks-Jankiewicz. 2003. Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Ediciones Mundiprensa-Universidad Autónoma Chapingo 487 p.
- Li B., Ravnskov S., Larsen J. 2007. Biocontrol of *Pythium* damping-off in cucumber by arbuscular mycorrhiza-associated bacteria from the genus *Paenibacillus*. *Biocontrol* (52):863-875.
- Llorca L. R. 2006. Prácticas de atmósfera, suelo y agua. Editorial Universidad Politécnica de Valencia 107 p.
- Mapes S. C., Mera O. L. 2009. El maíz. Aspectos Biológicos. En: Kato T. A., Mapes L. M., Mera J. A., Serratos R. A. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 19-32 p.
- McGonigle T. P., Fitter A. H. 1978. Growth and phosphorus inflows of *Trifolium repens* L. with a range of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal infection levels under field conditions. *New Phytologist* (108):59-65.
- McGonigle T. P., Miller M.H., Evans D. G., Fairchild G. L., Swan J. A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* (115):495-501.
- Mera O. L. 2009. Clasificación taxonómica del género *Zea* y parientes silvestres. En: Kato T. A., Mapes L. M., Mera J. A., Serratos R. A. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 19-32 p.
- Mickelson S. M., Kaepler M. 2005. Evaluation of six mycorrhizal isolates for their ability to promote growth of maize genotypes under phosphorus deficiency. *Maydica* (50):137-146.
- Miransari M., Bahrami H. A., Rejali F., Malakouti M. J. 2009. Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. *Soil and Tillage Research* (103):282-290.
- Montaño M. N., Alarcón A., Camargo-Ricalde S. L., Hernández-Cuevas L. V., Álvarez-Sánchez J., González-Chávez M. A., Gavito P. M., Sánchez-Gallen I., Ramos-Zapata J., Trejo D., Ferrera-Cerrato F. 2012. Research on arbuscular mycorrhizae in Mexico: an historical synthesis and future prospects. *Symbiosis* (57):111-126.
- Montaño A. N., Quiroz G. V., Cruz-Flores G. 2001. Colonización micorrícica arbuscular y fertilización mineral de genotipos de maíz y trigo cultivados en un andisol. *Terra* (19):337-344.
- Morton J. B., Benny G. L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and

- Gigasporineae, and two families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* (37):471-491.
- Munkvold L., Kjoller R., Vestberg M., Rosendahl S., Jakobsen I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytology* (164):357-364.
- Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mäder P., Boller T., Wiemken A. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* (69):2816-2824.
- Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mäder P., Boller T., Wiemken A. 2004. Impact of conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecosystem Ecology* (138):574-583.
- Oehl F., Sieverding F., Palenzuela J., Ineichen K., Alves da Silva G. 2011. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2(2):191-199.
- Ortega-Paczka R. 2003. La diversidad del maíz en México. In Esteva G., Marielle C. (Coordinadores). *Sin Maíz no hay País. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas, México*. D. F. 123-154p.
- Osonubi O. 1994. Comparative effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus fertilization on growth and phosphorus uptake of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.) plants under drought-stressed conditions. *Biology and Fertility of Soils* (18):55-59.
- Pérez-Luna C., Álvarez-Solís J. D., Mendoza-Vega J., Pat-Fernández J. M., Gómez-Álvarez R., Cuevas L. 2012. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en maíz con cultivo de cobertura y biofertilizantes en Chiapas, México. *Gayana Botánica* 69(1):46-56.
- Phillips J, Hayman D. 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):157-160.
- Pilon-Smits E. A., Terry N., Sears T., Kim H., Zayed A., Hwang S., Van Dun K., Verwoerd ThC., Krutwagen R.W.H, Goddijn O. J. M. 1998. Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *Journal of Plant Physiology* (152):525-532
- Pinior A., Grunewaldt-Stöcker G., Henning von A., Strasser R. J. 2005. Mycorrhizal impact on drought stress tolerance of rose plants probed by chlorophyll a fluorescence, proline content and visual scoring. *Mycorrhiza* (15):596-605.
- Porta C. J., López-Acevedo M. R., Roquero de Laburu C. 2003. *Edafología: para la agricultura y el medio ambiente*. 3ra edición. Mundi-Prensa, México D. F. 929 p.
- Quiñones-Aguilar E. E, Hernández-Acosta E., Rincón-Enríquez G., Ferrera-Cerrato, R. 2012. Interacción de hongos micorrízicos arbusculares y fertilización fosfatada en papaya. *Terra Latinoamericana* 30(2):165-176.

- Raaijmakers J. M., Paulitz T. C., Steinberg C., Alabouvette C., Moënne-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* (321):341-361.
- Ramos-Zapata J. A. Marrufo-Zapata D., Guadarrama P., Carrillo-Sánchez L., Hernández-Cuevas L., Caamal-Maldonado A. 2012. Impact of weed control on arbuscular mycorrhizal fungi in a tropical agroecosystem: a long-term experiment. *Mycorrhiza* 22:653-661
- Ravnskov S., Jakobsen I. 1995. Functional Compatibility in Arbuscular mycorrhizas measured as hyphal P transport to the plant. *New Phytologist* 129(4):611-618.
- Reigosa M. J. 2001. Handbook of plant ecophysiology techniques. Kluwer Academic Publishers. 452 p.
- Requena N., Serrano E., Ocón A., Breuninger A. 2007. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* (68):33-40.
- Rillig M. C., Mummey D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytology* (171):41-53.
- Robert M., Auge R. M., Heather D., Carl F., Sams E. A., Ghazala N., 2008. Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza* (18):115-121.
- Rosendahl S. 2008. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* (178):253-266.
- Ruiz-Lozano J. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* (55):1743-1750.
- Ruiz-Lozano J. M. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* (13):309-317.
- Ruiz-Lozano J. M., Azcon R., Gomez M. 1995. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance- physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2):456.
- Ryan H. M., Tibbett M. 2008. The Role of Arbuscular Mycorrhizas in Organic Farming. IN: Holger k., Bergstrom L. *Organic Crop Production-Ambitions and Limitations*. Springer. 189-229p.
- Ryan P. R., Dessaux Y., Thomashow L. S., Weller D. M. 2009. Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant and Soil* (321):363-383.
- Sánchez G., Goodman J. M., Stuber C. W. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Economic Botany* 54(1):43-59.
- Sheng M., Tang M., Chen H., Yang B., Zhang F., Huang Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* (18):287-296.
- Simard S., Durall D. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function and importance. *Canadian Journal of Botany* (82):1140-65.

- Smith F. A., Jakobsen I., Smith S. E. 2000. Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscularmycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytology* (147):357-366.
- Smith S. E., Read D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press in Elsevier. Great Britain. 785 p.
- Smith S. E., Smith A. F., Jakobsen I. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *American Society of Plant Biologists* 133(1):16-20.
- Smith S. E., Smith A. F., Jakobsen I. 2004 Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytology* 162(2):511-524.
- Subramanian K. S., Charest C., Dwyer L. M., Hamilton R. I. 1995. Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling. *New Phytology* (129):643-650.
- Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant physiology*. 4ra ed. Sinauer Associates. Massachusetts. U.S.A. 764 p.
- Trejo A. D., Zulueta R. R., Lara C. L. 2008. *Manual de prácticas para el estudio de la simbiosis micorrizógena arbuscular*. Textos Universitarios. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México. 134 p.
- Van der Heijden M. G., Wiemken A., Sanders I. R. 2004. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. *New Phytologist* (157):569-578.
- Voetberg G. S., Sharp R. E. 1991. Growth of the maize primary root at low water potentials. *Plant Physiology* 96(4):1125-1130.
- Wall D. H., Bardgett R. D., Behan-Pelletier V., Herrick J. E., Jones T. H., Karl R., Six J., Strong D. R., Van der Putten W. H. 2012. *Soil Ecology and Ecosystem Services*. Oxford University Press. 424p.
- Whipps J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* (52):487-511.
- Whipps J. M. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* (82):1198-1127.
- Xian-Can Z., Feng-Bin S., Sheng-Qun L., Tie-Dong, L. 2011. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on photosynthesis and water status of maize under high temperature stress. *Plant and Soil* (346):189-199.
- Zorer C. Z., Demir, S., Celebi R., Demirer D. E., Hakki, Y. I. 2010. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) applications on the silage maize (*Zea mays* L.) yield in different irrigation regimes. *European Journal of Soil Biology* (46):302-305.

9. ANEXOS

Anexo 1. Análisis edafológico del suelo utilizado



Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal (Campo Experimental Bajío)

ANÁLISIS COMPLETO DE SUELO

INFORMACION GENERAL			
No. Registro :	1539	Cliente :	UNAM
Fecha Recepción :	05/14/2013	Municipio :	Morelia
Fecha Entrega :	05/21/2013	Estado :	Michoacán
Prof. de Muestra :	0-25 cm.	Propietario :	Universidad Nacional Autónoma de México
Lote / Sector :		Rancho :	C.E. CRUJO - U.A. de México
		Tipo de Análisis :	Suelo
		Agricultura :	Riego
		Cultivo :	Maíz

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL SUELO	REACCIÓN DEL SUELO
Arena : 19.48% Arcilla : 53.24% Limo : 27.28% Tipo de Suelo : Arcilla Punto de Saturación : 50.0 % Mod. Alto Capacidad de Campo : 37.5 % Punto March. Perm. : 19.7 % Cond. Hidráulica : ND cm/hr ND Densidad Aparente : 1.17 g/cm ³ Color Munsell :	pH (1:2 agua) : 7.28 Neutro pH (1:2 CaCl ₂) : ND ND Carbonatos Totales (%) : 1.46 Bajo Requerimientos de Cal : No Req. Ton/Ha Requerimientos de Yeso : No Req. Ton/Ha

FERTILIDAD													
Muy Alto	[Bar chart showing nutrient levels: MO, N-Inorg, P- Bray, K, Ca, Mg, Na+, Fe, Zn, Mn, Cu]												
Alto													
Mod. Alto													
Mediano													
Mod. Bajo													
Bajo													
Muy Bajo													
Determinación	MO	N-Inorg	P-Bray	K	Ca	Mg	Na +	Fe	Zn	Mn	Cu		
Unidades	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm		
Resultados	2.74	23.2	5.80	303	2983	709	192	76.2	5.37	50.5	1.97		

* Es deseable que este elemento sea bajo

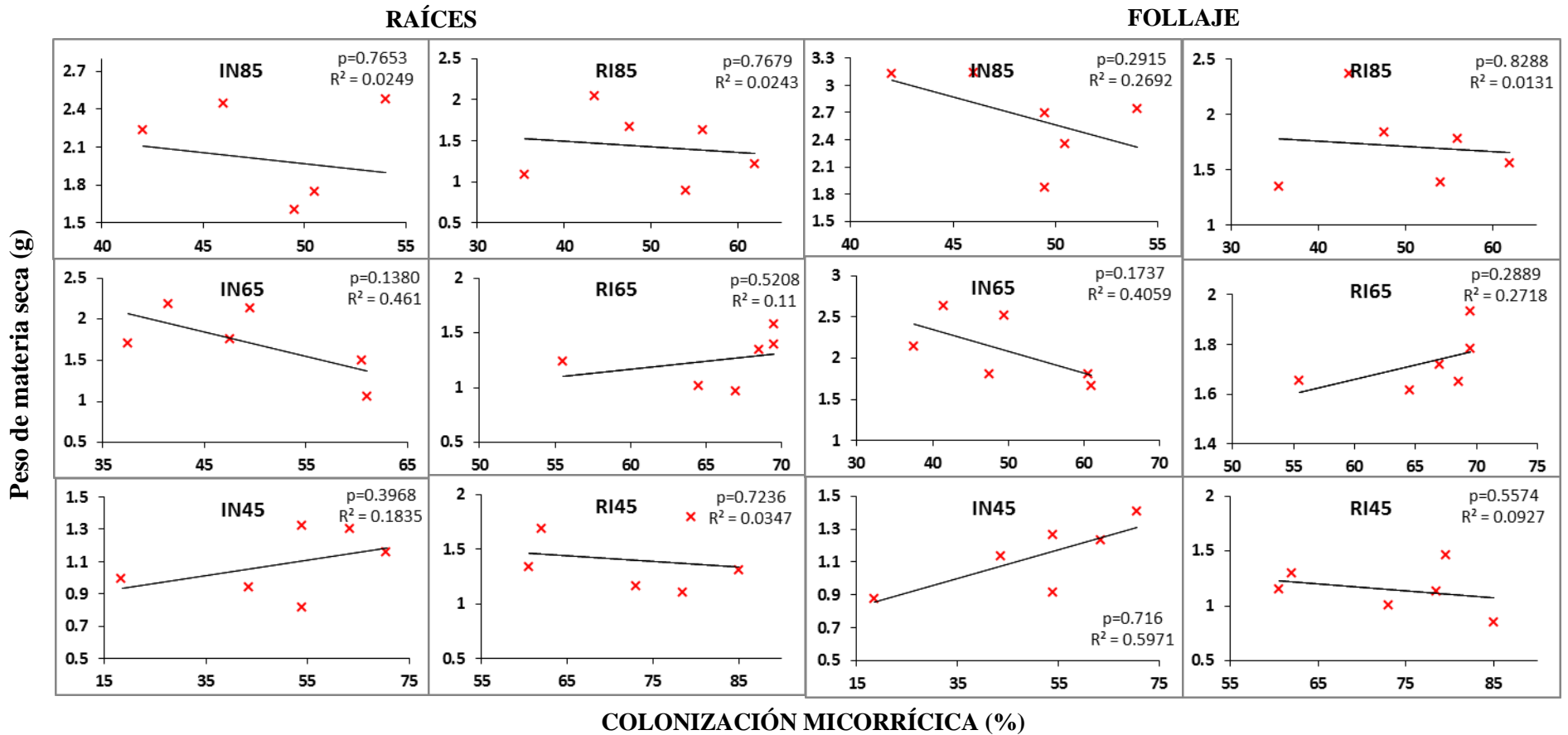
EXTRACTO DE SATURACION (SALINIDAD-SODICIDAD)				RELACIONES DE BASES DE CAMBIO			
Cec : 0.43 ds/m KAS : 4.47		pHe : 7.10 PSI : 3.72		[Bar chart showing base ratios: Ca/Mg, Mg/K, Ca+Mg/K, Ca/K]			
Cationes (meq/l)		Aniones (meq/l)		Muy Alto			
				Alto			
				Mod. Alto			
				Medio			
				Mod. Bajo			
				Bajo			
				Muy Bajo			
				Grado de			
				Sales RAS PSI			
Ca ++ : 0.40	CO ₃ : 0.40			Relación			
Mg ++ : 0.30	HCO ₃ : 0.60			Resultados			
Na + : 0.95	Cl - : 1.11			Rango Medio			
K + : 0.71	SO ₄ : 2.43			2-6 2-3 20-30 10-15			
PO ₄ : 0	N - NO ₃ : 0						

PORCENTAJE ACTUAL Y SUGERIDO DE LAS BASES DE CAMBIO									
Resultado	meq/100 gr	H	Al	Acidez Total Interm.	Ca ++	Mg ++	K +	Na +	CEC
	% Actual	ND	ND	ND	14.9	5.81	0.77	0.83	22.3
Sugerido	% Sugerido	0-5	0-5	0-10	65-75	10-20	ND	0-5	

COMENTARIOS	ATENTAMENTE
	IBQ MAYRA LIZBETH FRIAS P. ENCARGADO(A) DE LABORATORIO

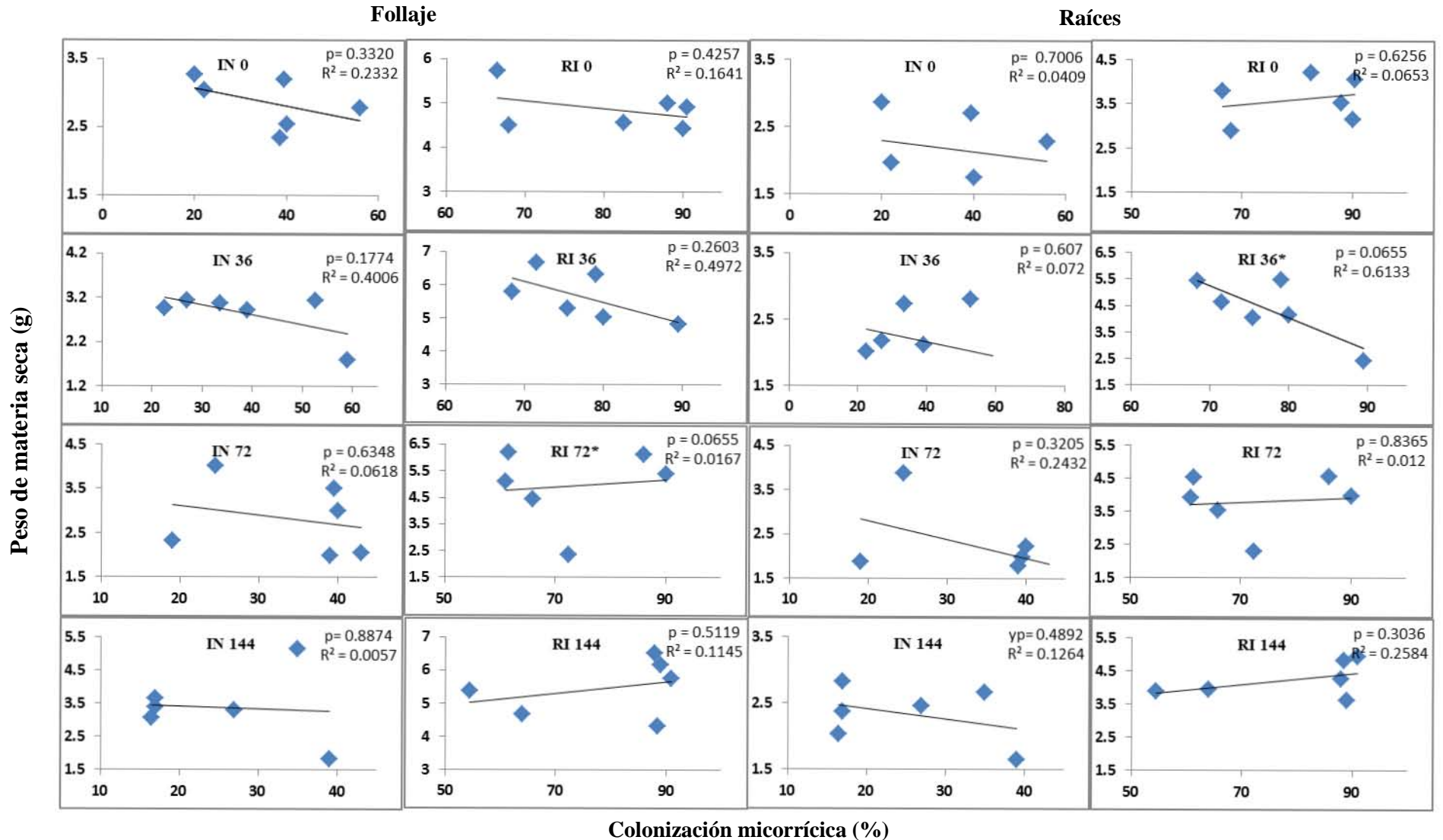
Km. 6.5 Carr. Celaya, San Miguel de Allende, Celaya, Gto. C.P. 38110; Tel (461) 61 1 53 23 Ext. 226 y 227 labsuelos.inifap@hotmail.com
FOR-SU-02, Revisión 3

Anexo 2. Análisis de correlación entre el porcentaje de colonización (eje horizontal) y el peso seco del follaje y raíces de maíz híbrido (eje vertical) bajo tres tratamientos de irrigación. En cada gráfica se muestra el valor de R^2 y el valor de p de un análisis de varianza con 0.05 %. Se identifica a los inóculos como: RI= *Rhizophagus intraradices*; IN= inóculo nativo y los tratamientos irrigación con 45=45% de CC, 65=65% de CC y 85=85 % de CC.



||

Anexo 3. Análisis de correlación entre el porcentaje de colonización total (eje horizontal) y el peso seco del follaje y raíces de maíz híbrido (eje vertical) bajo cuatro niveles de fertilización mineral. En cada gráfica se muestra el valor de R^2 y el p de un análisis de varianza con un test de LSC 0.05 estimado a partir de una $n=6$. RI= *Rhizopagus intraradices*; IN= inóculo nativo. 0= sin fertilización, 36= 36 mg/fósforo, 72= 72 mg/fósforo, 144= 144 mg/fósforo.



Anexo 4. Análisis de correlación entre el porcentaje de colonización total (eje horizontal) y el peso seco del follaje y raíces de maíz híbrido (eje vertical) bajo tres tratamientos de fertilización y dos niveles de irrigación. En cada gráfica se muestra el valor de R^2 y el P de un análisis de varianza con 0.05 % estimados a partir de $n=5$. RI= *Rhizophagus intraradices*; IN= inóculo nativo. Niveles de irrigación: 85= 85% de CC; 45= 45% de CC. Niveles de fertilización 0= sin fertilización, -P= macro y micro nutrientes sin fósforo, +P= fertilización al 100%.

