



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Nacional de Estudios Superiores,  
Unidad Morelia

“Interacciones entre grupos funcionales de microbios  
benéficos asociados a la rizósfera en plantas de maíz (*Zea  
mays*)”.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

JORGE ALBERTO LEÓN ESCAMILLA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Carlos Ernesto González Esquivel

COTUTOR DE TESIS: Biol. Miguel Bernardo Nájera Rincón

MORELIA, MICHOACÁN

JULIO, 2016



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

---

# LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Nacional de Estudios Superiores,  
Unidad Morelia

“Interacciones entre grupos funcionales de microbios  
benéficos asociados a la rizósfera en plantas de maíz (*Zea  
mays*)”.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

P R E S E N T A

JORGE ALBERTO LEÓN ESCAMILLA

**DIRECTOR DE TESIS:** Dr. Carlos Ernesto González Esquivel

**COTUTOR DE TESIS:** Biol. Miguel Bernardo Nájera Rincón

MORELIA, MICHOACÁN

JULIO, 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA  
SECRETARÍA GENERAL  
SERVICIOS ESCOLARES

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCES  
DIRECTORA DE GESTIÓN ESTRATÉGICA Y PRIMER INGRESO  
ENCARGADA DEL DESPACHO DE LA DIRECCIÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la **sesión ordinaria 05** del H. Consejo Técnico de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia celebrada el día **04 de mayo del 2016**, acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el Examen Profesional del alumno **Jorge Alberto León Escamilla** con número de cuenta **411098191**, con la tesis titulada: **"Interacciones entre grupos funcionales de microbios benéficos asociados a la rizósfera en plantas de maíz (Zea mays)"** bajo la dirección como **tutor** del Dr. Carlos Ernesto González Esquivel y como **co-tutor** el Biol. Miguel Bernardo Nájera Rincón.

El jurado queda integrado de la siguiente manera:

Presidente:	Dra. Ana Isabel Moreno Calles
Secretario:	Dr. Carlos Ernesto González Esquivel
Vocal:	Dr. Pablo Fabián Jaramillo López
Suplente:	Dr. Erik de la Barrera Montpellier
Suplente:	Biól. Miguel Bernardo Nájera Rincón

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Morelia, Michoacán a 11 de mayo del 2016.

DR. FERNANDO ANTONIO ROSETE VERGÉS  
SECRETARIO GENERAL

CAMPUS MORELIA

Apartado Postal 27-3 (Santa Ma. De Guad.) 58090, Morelia, Michoacán  
Antigua Carretera a Pátzcuaro N° 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta  
58190, Morelia, Michoacán, México, Tel: (443)322.38.05 y (55)56.23.28.05  
[www.enesmorelia.unam.mx](http://www.enesmorelia.unam.mx)

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a su Licenciatura en Ciencias Ambientales y al apoyo recibido a través del proyecto de investigación titulado "Insumos biotecnológicos para la producción orgánica de planta de aguacate (FOMIX 2009-2011 115994)", bajo la dirección de la Dra. Mayra Elena Gavito, cuyos fondos contribuyeron con la realización del presente trabajo.

También mi más sincero reconocimiento al laboratorio de Agroecología del IIES y a la tutoría del Dr. Carlos Ernesto González Esquivel y al Biol. Miguel Bernardo Nájera Rincón por su participación activa durante el proyecto. De igual forma agradezco la ayuda y el apoyo otorgado por mis compañeros de laboratorio y del Dr. John Larsen, quienes contribuyeron con su tiempo, paciencia y asesoría.

Asimismo, agradezco a la Dra. Ana Isabel Moreno Calles, al Dr. Pablo Fabián Jaramillo López y al Dr. Erick de la Barrera Montpellier por su apoyo y disposición para ser miembros del jurado en el examen profesional. De igual forma agradezco el apoyo del departamento de Servicios Escolares y en especial del Lic. Alejandro Rebollar Villagómez.

## El cienciaambientólogo maldito

“Sonriente como pocos y algo socarrón.

Simplemente no, no puede tener la razón”. El cienciaambientólogo maldito va por la vida sin preocuparse, esbozando una sonrisa y comentando lo que le viene en gana. El cienciaambientólogo maldito no se preocupa por el trabajo, por el dinero, por el estudio, ni por la fama. No le importa el porvenir, ni las cosas que hay por hacer, sólo vive el momento y hace de su vida algo así como su propio cuento, ese que le gusta a él, ese que para él vale la pena vivirse.

La gente y muchos de sus colegas lo miran siempre alarmados ¡No puede ser! dicen, ¿cómo puede ir alguien por la vida tan equivocado? El cienciaambientólogo maldito sigue su andar, ése que siempre lo ha caracterizado y vuelve a reír. Entre tanto, sus detractores siguen cuestionándole sobre sus modos y maneras de vivir.

Mientras que la mayoría de la gente se rige por ciertas reglas en común, a él sólo lo gobiernan las suyas, lo moral e inmoral para él dependen del contexto y el deber no es más que un vano invento. Hace lo que le viene en gana, dice lo primero que se le ocurre, le tiene sin cuidado si la gente se molesta por ello o no, de todos modos él lo seguirá haciendo; porque así es él, porque no va a cambiar, porque no lo van a cambiar, porque no tiene que hacerlo y porque no quiere hacerlo.

¿Qué tal si las personas que creímos que estaban equivocadas realmente siempre estuvieron en lo correcto? ¿Qué tal si el camino a seguir no siempre fue el recto? ¿Y si ir por ahí con reservas no es de lo que se trata la vida? ¿Y si sólo en este efímero momento lo único que importa es disfrutar lo que tienes y vivir con alegría? ¿Y si la vida para cada quién tiene distintos significados y por eso el cienciaambientólogo maldito nunca los ha criticado?

Habrá que volver a pensar entonces quién está equivocando y quién no lo está. Habrá que reflexionar sobre la complejidad y lo ambiental. Habrá que mirarnos nuevamente y cuestionar nuestro proceder. Habrá que replantearnos los problemas y cómo se quieren ver.

Muchos lo aborrecen, tal vez porque hay cierta parte de ellos que no les gusta y la ven reflejada en él. Los que no lo han comprendido le han retirado su amistad, lo han alejado de su vida y le han dado la espalda. Yo por mi parte, le llamo mi amigo y lo admiro.

Porque con su proceder sigue enseñando, con su actuar nos está desafiando, porque al oírlo hablar nos damos cuenta que sabe lo que dice y lo que hace, y siempre lo ha sabido. Porque hasta las ciencias ambientales a su hijo han desconocido. Porque a veces es difícil soportar tanto calor cuando se ha acostumbrado al frío.

El cienciaambientólogo maldito camina, oye sus críticas y sigue caminando.

José Ricardo Vélez Molina.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, amigos, pareja, compañeros, maestros y a todas esas personas que en algún momento compartieron conmigo un poco de su vida; tiempo vital que me hizo crecer y reflexionar acerca del camino que quiero tomar y el lugar a donde sueño llegar.

También quiero reconocer mis múltiples errores, todas esas cosas que sabía que estaban mal, pero aun así continúe con ellas sin pensar en las consecuencias. A todos esos viajes y duros trabajos que me mostraron lo vulnerable que puedo ser.

Gracias a todos y todo por mostrarme el amor verdadero por la vida.

“La vida se divide en cuatro partes: amar, sufrir, luchar y vencer; El que ama, sufre; el que sufre, lucha; y el que lucha, vence.”

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. ANTECEDENTES .....	7
2.1 <i>Zea mays</i> L. ....	7
2.1.1 Contexto actual de la producción del maíz .....	8
2.2 Uso de agroquímicos .....	9
2.2.1 Principales problemas derivados del uso de agroquímicos .....	10
2.3 Microorganismos benéficos y su multifuncionalidad en el agroecosistema .....	11
2.4 Interacción entre grupos funcionales de microorganismos .....	13
2.5 Características generales de los hongos estudiados .....	15
2.5.1 <i>Rhizophagus irregularis</i> .....	16
2.5.2 <i>Trichoderma</i> spp. ....	18
2.5.3 <i>Beauveria bassiana</i> .....	19
3. HIPÓTESIS .....	21
4. OBJETIVOS .....	21
5. METODOLOGÍA .....	22
5.1 Material biológico .....	22
5.2 Pruebas preliminares de calidad en los productos .....	22
5.3 Elaboración y manejo del sustrato .....	23
5.3.1 Estimación de capacidad de campo (CC) de la mezcla de suelo .....	23
5.4 Condiciones de crecimiento de las plantas .....	24
5.5 Diseño experimental.....	24
5.6 Cosecha y variables.....	26
5.6.1 Extracción de muestras y evaluación de desempeño vegetal.....	26
5.6.2 Coeficiente alométrico entre la raíz/tallo .....	27
5.6.3 Determinación de Nitrógeno total (N) y Fósforo total (P) en el material vegetal de la parte aérea de plantas de Maíz de 8 semanas.....	27
5.6.4 Determinación del porcentaje de colonización de <i>R. irregularis</i> .....	29
5.7 Análisis estadístico.....	30

6. RESULTADOS .....	31
6.1 Pruebas de calidad en los productos .....	31
6.2 Efecto de la inoculación de tres grupos funcionales de microorganismos benéficos en el desempeño vegetal y colonización de <i>R. irregularis</i> de plantas de maíz 4 semanas .....	32
6.3 Efecto de la inoculación de tres grupos funcionales de microorganismos benéficos en el desempeño vegetal, concentración de nutrientes y colonización de <i>R. irregularis</i> en plantas de maíz 8 semanas .....	38
6.4 Correlación entre la colonización y el desempeño vegetal .....	49
7. DISCUSIÓN .....	50
7.1 Pruebas de calidad en los productos bioinoculados .....	50
7.2 Efecto de la inoculación individual y combinada de tres microorganismos benéficos sobre el desarrollo vegetal de plantas de maíz .....	51
7.3 Concentración de N y P .....	57
7.4 Colonización de <i>R. irregularis</i> .....	58
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	60
9. REFERENCIAS .....	63
10. ANEXO .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b> Volumen de producción, importaciones y rendimiento del maíz en México.....	8
<b>Fig. 2</b> Ciclo de vida de los hongos micorrízicos arbusculares, modificado de Requena et al., 2007 .....	17
<b>Fig.3</b> Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma</i> spp (Barocio-Hernández, 2014).....	19
<b>Fig. 4</b> Infección producida por <i>B. bassiana</i> sobre Picudo del tabaco ( <i>Trichobaris</i> spp.) y su estructura microscópica (Barocio-Hernández, 2014).....	20
<b>Fig. 5</b> Método de estimación de la colonización micorrízica. Modificado de Mc Gonigle et al. 1990 .....	30
<b>Fig. 6</b> Efecto sobre el peso seco aéreo de los tratamientos sin y con <i>T. harzianum</i> de la primera cosecha (4 semanas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de $n=20$ y analizadas con la prueba de LSD .....	33
<b>Fig. 7</b> Efecto de la aplicación de <i>B. bassiana</i> y <i>T. harzianum</i> sobre el peso seco de la raíz de la primera cosecha (4 semanas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de $n=10$ y analizadas con la prueba de LSD .....	34
<b>Fig. 8</b> Efecto de la aplicación de <i>B. bassiana</i> y <i>T. harzianum</i> sobre la biomasa total de plantas de maíz de 4 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de $n=10$ y analizadas con la prueba de LSD .....	35
<b>Fig. 9</b> Efecto de la presencia de <i>B. bassiana</i> sobre el coeficiente alométrico raíz/tallo de maíz de 4 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de $n=20$ y analizadas con la prueba de LSD.....	36
<b>Fig. 10</b> Efecto de la inoculación de cepas comerciales de hongos benéficos sobre la colonización de <i>R. irregularis</i> de plantas de maíz de 4 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de $n=5$ y analizadas con la prueba de LSD.....	37
<b>Fig. 11</b> Efecto de la aplicación de <i>B. bassiana</i> , <i>T. harzianum</i> y <i>R. irregularis</i> sobre el peso seco aéreo de la cosecha de plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de $n=5$ y analizadas con la prueba de LSD.....	42

- Fig. 12** Efecto de la aplicación de *B. bassiana* y *R. irregularis* sobre el peso seco de la raíz de plantas de maíz de 8 semanas. Barras de error estándar estimadas a partir de n=10 y analizadas con la prueba de LSD.....43
- Fig. 13** Efecto de la aplicación de *B. bassiana* y *R. irregularis* sobre la biomasa total de plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de n=10 y analizadas con la prueba de LSD .....44
- Fig. 14** Efecto de la aplicación de *B. bassiana* y *R. irregularis* sobre el coeficiente alométrico raíz/tallo de plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de n=10 y analizadas con la prueba de LSD .....45
- Fig. 15** Efecto de la aplicación de *T. harzianum* y *R. irregularis* sobre la concentración de nitrógeno en plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de n=10 y analizadas con la prueba de LSD 0.05% .....46
- Fig. 16** Efecto de la presencia de *R. irregularis* sobre la concentración de fósforo en plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas con una n=20 y analizadas con la prueba de LSD.....47
- Fig. 17** Efecto de la inoculación de cepas comerciales de hongos benéficos sobre la colonización de *R. irregularis* de plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimada con una n=5 y analizada con una prueba de LSD .....48
- Fig. 18** Coeficiente de correlación de  $r^2$  entre la colonización de *R. irregularis* y la concentración de fósforo de plantas de 8 semanas .....49

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Macronutrientes usados para la fertilización de los tratamientos.....	24
<b>Tabla 2</b> Diseño experimental.....	25
<b>Tabla. 3</b> Distribución aleatoria en invernadero (T=tratamiento Re= Repetición).....	25
<b>Tabla 4.</b> Control de calidad de bioinoculantes comerciales: hongos entomopatógenos y antagonistas .....	31
<b>Tabla. 5.</b> Valores de probabilidad ( $p$ ) del análisis de varianza para el desempeño vegetal y colonización de la raíz de plantas de maíz de cuatro semanas inoculadas con tres diferentes cepas de hongos benéficos $*=p \leq 0.05$ , $**=p \leq 0.01$ .....	32
<b>Tabla. 6.</b> Valores de probabilidad ( $p$ ) del análisis de varianza para el desempeño vegetal de plantas de maíz inoculadas con tres diferentes cepas de hongos benéficos en un experimento de 8 semanas. $*=p \leq 0.05$ , $**= p \leq 0.01$ .....	39
<b>Tabla. 7.</b> Valores de probabilidad ( $p$ ) del análisis de varianza para la concentración de macronutrientes en la parte aérea y la colonización de la raíz de plantas de maíz inoculadas con tres diferentes cepas de hongos benéficos en un experimento de 8 semanas $*=p \leq 0.05$ , $****=p \leq 0.0001$ .....	40
<b>Tabla. 8</b> Coeficientes de correlación entre colonización y desempeño vegetal .....	49

## RESUMEN

Ante los efectos negativos que ocasiona el uso de agroquímicos se buscan alternativas que disminuyan su impacto y permitan un manejo sustentable de plagas y enfermedades en los agroecosistemas, manteniendo una buena producción. El uso de microorganismos benéficos representa una alternativa para reducir el consumo de fertilizantes y plaguicidas, además de su potencial para disminuir la dependencia de los derivados del petróleo y al mismo tiempo los costos de operación, beneficiando al socioecosistema y al medio en el que se desarrolla.

Sin embargo, actualmente el conocimiento sobre las interacciones y el uso adecuado de los grupos funcionales de microorganismos benéficos es limitado, incrementando el riesgo de generar un desequilibrio en el ecosistema. En respuesta a ello, este trabajo consistió en el estudio de los efectos y las interacciones originadas por la combinación de diferentes grupos funcionales de microorganismos, tales como hongos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus irregularis-HMA*), hongos promotores del crecimiento y antagonistas (*Trichoderma harzianum*) y hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*).

El estudio se llevó a cabo con maíz cultivado en suelo estéril, fertilizado bajo condiciones de invernadero. El diseño experimental consistió en la inoculación de microorganismos benéficos de manera individual y combinada, previo a sembrar el maíz, divididos en ocho tratamientos, con distribución al azar y cinco repeticiones, esto por dos etapas de cosecha. Se midió el desempeño vegetal, porcentaje de colonización de *R. irregularis* y concentración de nitrógeno y fósforo en la parte aérea. Los resultados sugieren que la inoculación combinada de los tres diferentes grupos funcionales de microorganismos es posible, ya que contribuyen con el mejoramiento de las variables en mayor o menor medida dependiendo de su combinación. Además de que la inoculación combinada podría contribuir con el desarrollo integral del cultivo.

El análisis estadístico multifactorial (ANOVA) mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en los efectos originados por los inóculos individuales y combinados de las cepas comerciales. En el desempeño vegetal la inoculación combinada de *B. bassiana* con *R. irregularis* o *T. harzainum* obtuvieron los mayores beneficios en comparación con los tratamientos inoculados individualmente. En los tratamientos con presencia de los tres

microorganismos se observó algo similar aunque con menor beneficio. Una de las interacciones negativas observadas fue la de *T. harzianum* con *R. irregularis*.

Por otra parte la colonización de HMA fue beneficiada por su interacción con el resto de los microorganismos, lo que incrementó la concentración de fósforo en presencia de *R. irregularis*. Mientras tanto, el nitrógeno fue mayor en los tratamientos inoculados con *T. harzianum*. Cabe destacar que las interacciones y los efectos se modificaron a través del tiempo.

Con el presente estudio se busca resaltar la importancia de las interacciones entre los diferentes grupos funcionales de microorganismos rizosféricos en el manejo de la nutrición y salud de las plantas.

**Palabras clave:** Microorganismos benéficos, agroecosistemas, control biológico, maíz, promotores de crecimiento, interacciones microbianas, grupos funcionales, *Beauveria bassiana*, *Rizophagus irregularis*, *Trichoderma harzianum*.

## ABSTRACT

Upon the negative effects caused by the use of agrochemicals, alternatives that diminish its impact and allow for a sustainable handling of pests and diseases in agroecosystems are searched for, maintaining a good production. The use of beneficial microorganisms represents an alternative to reduce the consumption of fertilizers and pesticides. Furthermore, its use can reduce the dependence to oil derivatives and, at the same time, operation costs, benefiting the socio-ecosystem and the surrounding environment.

Nevertheless, the current knowledge on the correct use of beneficial microorganisms and the interactions between functional groups is limited, increasing the risk of generating an imbalance in the ecosystem. In response, this work consisted in the study of the effects and interactions originated by the combination of different functional groups of microorganisms, such as arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus irregularis* - AMF), growth promoter and antagonistic fungi (*Trichoderma harzianum*), and entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*).

The study was carried out with maize plants grown in sterile soil and fertilized under greenhouse conditions. The experimental design consisted in the individual and combined inoculation of beneficial microorganisms before planting. It was divided into eight randomly distributed treatments, with five replicates and two harvest dates. Measurements were taken for plant performance, percentage of colonization of *R. irregularis* and concentration of nitrogen and phosphorous in the aerial part of the plant. The results suggest that the combined inoculation of the three different functional groups of microorganisms is possible, due to the fact that they contribute with improving the variables to a greater or lesser extent depending on the combination. Additionally, the combined inoculation might contribute to the integral development of the crop.

The multifactorial statistical analysis (ANOVA) showed statistical significance ( $P \leq 0.05$ ) in the effects originated by the individual and combined inoculation of the commercial strains. The combined inoculation of *B. bassiana* with *R. irregularis* or *T. harzianum* obtained the greater benefits in comparison with the individually inoculated treatments. In the treatments with the presence of the three microorganisms, a similar benefit was noticed,

although to a lesser extent. One of the negative interactions observed was that of *T. harzianum* with *R. irregularis*.

Moreover, the colonization of HMA was benefited by its interaction with the rest of the microorganisms, which contributed to rising concentrations of phosphorous in the presence of *R. irregularis*. Meanwhile, nitrogen concentration was higher in the treatments inoculated with *T. harzianum*. It is worth mentioning that the interactions and the effects were modified through time.

The present study seeks to emphasize the importance of interactions between the different functional groups of rhizospheric microorganisms in handling the nutrition and health of plants.

**Key words:** beneficial microorganisms, agro-ecosystems, biological control, maize, growth promoters, microbial interactions, functional groups, *Beauveria bassiana*, *Rizophagus irregularis*, *Trichoderma harzianum*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años el ser humano se ha beneficiado por los grandes avances originados a partir de la revolución verde, obteniendo una mayor producción en los cultivos y aumentando la rentabilidad del campo agrícola. Lo anterior, mediante la mecanización, el desarrollo de especies mejoradas altamente productivas y resistentes a los factores biofísicos, además de un buen control de plagas y fertilización con productos químicos (Gliessman, 2002). Uno de los cultivos que se ha beneficiado ampliamente por la aplicación de estas prácticas de manejo ha sido el maíz, el cual es una de las principales fuentes de carbohidratos para las familias mexicanas (Arámbula et al., 2004).

La producción de maíz como muchos de los cultivos agrícolas actuales, requiere de una gran cantidad de insumos, tales como fertilizantes y plaguicidas, los cuales son producidos a partir de derivados del petróleo, uno de los recursos finitos del planeta. Se cree que el consumo de agroquímicos continuará en aumento al igual que la productividad agrícola, por lo que el panorama a largo plazo es totalmente incierto (FAOa, 2015; Gavi, 2013; OCDE, 2011). Adicionalmente, se sabe que el uso de agroquímicos puede contribuir con la alteración de los ciclos de nutrientes, la pérdida de biodiversidad, el deterioro del suelo agrícola, la contaminación de mantos acuíferos, aumento en la vulnerabilidad ante amenazas externas, entre muchas otras desventajas directas e indirectas que impactan a los socioecosistemas (HLPE, 2012; López-Geta et al., 1992; Norse, 2003).

Ante los riesgos existentes, se buscan alternativas que reduzcan el impacto negativo de las prácticas agrícolas convencionales, manteniendo una buena productividad agrícola. Una de estas opciones es el uso de microorganismos benéficos, que pueden contribuir con el desarrollo vegetal de las plantas, la protección contra patógenos y una mayor resistencia al estrés, todo esto disminuyendo los efectos negativos en el ecosistema (García-Núñez, 2010; Gliessman, 2002; Lecuona et al., 1996). No obstante, el conocimiento se encuentra sectorizado y especializado, ya que en la mayor parte de las investigaciones se estudian los beneficios individuales de cada uno de los microorganismos, sin tomar en cuenta su desarrollo dentro de sistemas complejos llenos de interacciones (García-Núñez, 2010). La

falta de información sobre las interacciones entre los diferentes grupos funcionales de microorganismos aumenta el riesgo de hacer un mal uso de esta alternativa (Barocio-Hernández, 2014; Zimmermann, 2007; Zitlalpopoca, 2015). Por tal razón es importante determinar el carácter de las interacciones entre los diferentes grupos funcionales de microorganismos y al mismo tiempo establecer cuales son sus efectos en los cultivos, para así mejorar su uso y evitar posibles efectos negativos. Por lo que en la presente investigación se busca ampliar el conocimiento sobre el tema, además de promover investigaciones futuras que incluyan el impacto social y económico de su aplicación.

Para lograr lo anterior, se realizó un experimento en invernadero bajo condiciones controladas, en el cual se cultivaron semillas de maíz híbrido NB9 en presencia de diferentes grupos funcionales de microbios beneficios, tales como *B. bassiana*, *T. harzianum* y *R. irregularis*. Se determinó su interacción mediante los efectos reflejados en la colonización micorrizica de la raíz y en el desarrollo y nutrición vegetal del maíz.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Zea mays* L.

*Zea mays* L., comúnmente conocido como maíz, cuyo nombre tiene origen en el lenguaje caribeño de la isla de Haití, en donde era llamado por los nativos “Mahiz” (Reyes, 1990). Dentro de la cosmovisión prehispánica esta planta ha representado el componente indispensable para engendrar la vida, además de ser uno de los principales cultivos que impulsaron el desarrollo económico, social, cultural y religioso de las poblaciones mesoamericanas hasta la actualidad (FAO e IPGRI, 2001; Novara & Neumann, 2012). Recientemente el consumo de maíz continua siendo de vital importancia alrededor del mundo, ocupando el tercer puesto en la producción de cereales, solo por debajo del trigo y el arroz (Aydinsarkir et al., 2013).

Este importante cereal perteneciente a la familia Poaceae, es la única especie del género *Zea* que es cultivada para el consumo humano, ya que cuenta con un alto contenido de carbohidratos y una ruta fotosintética C4 que hace que su producción sea rápida, elevada y continua (Paliwal RL & Granados G., 2015). Factores que al ser ligados con su gran historial de domesticación, hacen de este un cereal con excelentes cualidades para ser cultivado en la mayoría de los suelos, climas y altitudes (Salazar & Godínez, 2010).

Según los vestigios arqueológicos encontrados en el valle de Tehuacán, Puebla, la domesticación de esta Gramineae data de más de 7 mil años, poniendo a México en el primer lugar de la lista de los centros de origen y domesticación de esta especie. La cual se ha transformado y ha atravesado un gran camino de manejo y fitomejoramiento (Salazar & Godínez, 2010). Se han reportado 436 razas de maíz en el continente americano, de las cuales la mayor diversidad se encuentra en México con 56 razas y más de 200 variedades (Goodman M N & L W Brown, 1988; Mera, 2009).

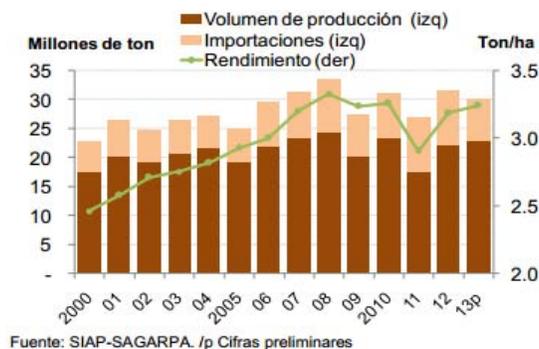
Muchas de las razas encontradas en México han formado parte del germoplasma para el desarrollo de variedades híbridas, que buscan aumentar el rendimiento, la adaptabilidad y la resistencia a las enfermedades y plagas (Sánchez & Goodman, 1992). Ejemplo de esto es el

maíz híbrido NB9 de la empresa Novasem®, cuya característica principal es una mayor tolerancia a condiciones de estrés hídrico y una buena adaptación a la zona del Bajío Mexicano y la Ciénega Occidente (Novasem, 2015).

### 2.1.1 Contexto actual de la producción del maíz

Según la base de datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2014), México tuvo una producción de 23.3 millones de toneladas de maíz, con un valor aproximado de 72.5 millones de pesos mexicanos en el año 2014. Mientras que en 2015 se estima que la producción fue de 23.5 millones de toneladas, colocando a nuestro país en competencia por la sexta posición de los diez principales países productores de este cereal en el mundo (Producción Mundial Maíz, 2015). Sin embargo, hasta hace 5 años México se ubicaba en el cuarto lugar, solo después de Brasil, situación que podría indicar un posible conflicto en el desarrollo agrícola del país.

La población mexicana tiene al maíz como base de su alimentación, además de ser una importante materia prima para el sector agropecuario e industrial, por lo que México se ve en la necesidad de importar entre ocho y diez millones de toneladas anualmente. Lo que corresponde a casi la mitad de su producción, cuestión que lo debilita ante cualquier variación del mercado (SIAP-SAGARPA, 2014). El aumento de la variación entre el volumen de producción, su importación y el rendimiento continuará aumentando con el paso del tiempo, pudiendo incrementar los efectos negativos en la economía e impactar en el equilibrio de los ecosistemas por la constante presión de las prácticas de manejo actuales (Fig.1).



**Fig. 1** Volumen de producción, importaciones y rendimiento del maíz en México

Al no ser un país autosuficiente y tener una población que se duplicará en los próximos 39 años (INEGI, 2010), México se ve en la necesidad de aumentar su área productiva y al mismo tiempo generar nuevos mecanismos de producción que le permitan atender las necesidades básicas de un país en constante desarrollo y crecimiento. Teniendo como reto principal para el 2050 aumentar en 10% las tierras cultivables (2000AGRO, 2014). Dicha expansión requiere de un manejo integral que permita mantener el equilibrio de los agroecosistemas.

## **2.2 Uso de agroquímicos**

Ante la necesidad de aumentar la producción de alimentos por el constante crecimiento poblacional y de los mercados internacionales, fue como se volvió prioritaria la búsqueda de técnicas y nuevos insumos que permitieran que los sistemas agrícolas fueran más productivos y eficientes. Los esfuerzos más representativos de la época pasada y que aún se siguen desarrollando, fueron los derivados de la llamada revolución verde. En donde el mejoramiento de las especies, la mecanización de las prácticas agrícolas, el uso de agroquímicos para la fertilización y el control químico de plagas, generaron una de las más grandes alzas en la productividad agrícola en la historia del ser humano (Gliessman, 2002).

México ha sido un país ampliamente apoyado durante esta revolución, debido a la importancia y gran diversidad de sus especies agrícolas. Actualmente los paquetes tecnológicos (agroquímicos, semilla y la mecanización) han modificado en gran medida la estructura agrícola y rural, haciendo que día a día la dependencia de estos insumos se incremente ante la rentabilidad económica y productiva que estos generan (Gliessman, 2002).

Hasta el 2013, la utilización promedio mundial de fertilizantes fue de 120 kilogramos de fertilizante por hectárea de tierras cultivadas, posicionando a México muy por debajo de este consumo con 78 kg/ha (Banco Mundial, 2013). En cuanto a herbicidas, plaguicidas, fungicidas y bactericidas en México se usaron alrededor de 111 mil toneladas de estos agroquímicos en 2013 (FAOSTAT, 2013). Se prevé que en los próximos años el consumo mundial de estos insumos aumente en un 1.8%, esto a la par de la producción agrícola (FAOa, 2015). El aumento en el consumo de estos agroquímicos es alentador para las

empresas productoras, sin embargo, para los países que importan la mayor cantidad de sus insumos tal es el caso de México, sus problemas de dependencia y su debilidad frente a las fluctuaciones del mercado podrían aumentar de la misma manera (Romero, 2013).

### **2.2.1 Principales problemas derivados del uso de agroquímicos**

Actualmente la producción de agroquímicos es totalmente industrializada, lo que permite obtener grandes cantidades de producto a costos relativamente bajos, con la expectativa de un mercado en constante crecimiento. Sin embargo, al ser derivados del petróleo y fuentes minerales no renovables su futuro es totalmente incierto e inestable (Gavi, 2013; OCDE, 2011)

La efectividad de estos productos a corto plazo está altamente probada, sin embargo contempla muy poco las implicaciones futuras en el medio ambiente. El cual se mantiene gracias a procesos naturales que al ser alterados degradan la calidad del sistema, provocando su progresiva pérdida (Gliessman, 2002).

Los agroquímicos pueden alterar los ciclos del nitrógeno, fósforo y azufre, ya que estos solo son aprovechados entre un 30 y 45%. El resto se pierde mediante procesos de lixiviación y volatilización, provocando que la agregación de estos insumos supere a la fijación de nutrientes (Norse, 2003).

Algo similar sucede con los plaguicidas, los cuales tienen 1% de efectividad contra los blancos (plagas), mientras que alrededor del 55% es retenido por el suelo y follaje, y el resto se pierde (Brady & Weil, 1996). Aunado a su reducida eficiencia, se encuentra el mal manejo de los residuos, la pobre legislación y la falta de información dentro de sus usuarios, lo que puede generar episodios críticos de contaminación.

La volatilización y lixiviación de estos insumos origina su movilización, causando eutrofización, contaminación de cuerpos de agua, lluvia acida y la contribución de hasta el 2% de las emisiones de CO<sub>2</sub> y su equivalente a la atmósfera (HLPE, 2012; López-Geta et al., 1992). Estos son solo algunos de los problemas más comúnmente conocidos, de los cuales se pueden derivar implicaciones negativas en la red trófica del ecosistema, problemas en la salud humana, pérdida de cultivos, entre otros (Karam-Quñones, 2002).

La biodiversidad se encuentra de igual forma envuelta en esta telaraña de problemas, ya que se ve amenazada por los plaguicidas que arrasan de manera indiscriminada tanto con los componentes negativos como con los positivos para el cultivo. Situación que abre la oportunidad para la intromisión de nuevas plagas o aumenta la resistencia de estas a los plaguicidas, lo que orilla a los agricultores a comprar nuevos y más efectivos agrotóxicos, continuando con el aumento de la dependencia (Gliessman, 2002). Actualmente el 75% de la diversidad genética de los cultivos se ha perdido y el restante se encuentra bajo amenaza (Thomas et al., 2004).

Otros de los puntos a considerar dentro de la problemática de los agroquímicos son:

- ❖ No incluyen las externalidades ambientales (Pretty et al., 2001)
- ❖ Es difícil y complejo hacer un uso eficiente de los fertilizantes (Goulding, 2000)
- ❖ El suelo es un recurso no renovable que se degrada por las malas prácticas agrícolas (Norse, 2003).

A partir de problemáticas como estas surge la necesidad de buscar alternativas para mantener la vida como la conocemos. Dando origen a grupos cuyos objetivos se centran en generar sistemas agrícolas económicamente viables, altamente productivos y ambientalmente adecuados, bajo principios ecológicos que soporten el diseño y manejo de los ecosistemas agrícolas (agroecosistemas) (Gliessman, 2002).

### **2.3 Microorganismos benéficos y su multifuncionalidad en el agroecosistema**

Los agroecosistemas son los ecosistemas sometidos a continuas modificaciones bióticas y abióticas para la producción de alimentos para el consumo y manejo humano (Gliessman, 2002). Dentro de ellos existen diversos mecanismos bióticos encargados de regular su funcionamiento, tales como relaciones de parasitismo, competencia y simbiosis, entre otras. Suceso comúnmente observado en comunidades con una gran biodiversidad (Alexander, 1971). Una de estas comunidades se encuentra en la rizósfera, la cual corresponde a la unidad de suelo circundante a las raíces de las plantas (Sarabia-Ochoa, 2012).

Los suelos agrícolas son depositarios de un sin número de interacciones, las cuales se dan entre los microorganismos del primer horizonte y de manera más activa en la rizósfera de la planta. En este subsistema agrícola podemos encontrar microorganismos como nematodos, bacterias y hongos (García-Núñez, 2010). Microorganismos cuyas interacciones pueden ser directas o indirectas, de carácter negativo o positivo. Por lo tanto, su efecto depende de las habilidades para desarrollarse junto con los componentes de su entorno. Algunas interacciones son mutualistas (sinergia) en donde dos o más organismos se desarrollan en conjunto y al mismo tiempo se benefician, otras interacciones son benéficas para uno y neutras para el otro (comensalismo). De manera negativa se encuentra el antagonismo, parasitismo y competencia por recursos o espacio (Barocio-Hernández, 2014; Martínez-Medina et al., 2010; Zimmermann, 2007).

Las interacciones en la rizósfera contribuyen con el mantenimiento de la estructura del suelo y los ciclos de nutrientes, regulando la materia orgánica y los procesos hídricos. También funcionan como antagonistas y controladores de agentes externos, efecto que se da como un beneficio derivado de la simbiosis planta-microorganismo (FAO, 2015). Sin embargo, no todos los microorganismos son benéficos para el cultivo, por lo que contar con un conocimiento amplio de su comportamiento y sus interacciones con su entorno, podría contribuir en mejorar la forma en la que manejamos los agroecosistemas, usando estos componentes bióticos como alternativas al uso de agroquímicos (García-De Salamone, 2011).

Existen diversos microorganismos con potencial benéfico para los cultivos, sin embargo no todos estos cuentan con la posibilidad de ser producidos de forma masiva. Por lo cual, para generar cepas comercialmente viables es necesario que los costos de producción sean bajos, con medios simples y que los microorganismos tengan un desarrollo rápido, con una producción alta de esporas y una buena tolerancia al almacenamiento, todo esto sin afectar su funcionalidad y viabilidad (Feng et al., 1994; García-De Salamone, 2011).

Los hongos cuentan con una alta diversidad, amplia distribución y una buena abundancia, por lo que han sido un importante objeto de estudio. Su papel en la rizósfera destaca principalmente por sus cualidades como promotores del crecimiento, antagonistas, biofungicidas y entomopatógenos. Siendo este último grupo uno de los más estudiados, con

un poco más de 700 especies que se encuentran dentro de 100 géneros (García-Núñez, 2010; Lecuona et al., 1996).

Los hongos entomopatógenos son usados para el control biológico de diversas plagas de artrópodos en los cultivos, desde insectos voladores del orden Diptera y Lepidoptera (moscas y palomillas) hasta insectos chupadores y coleópteros (escarabajos), entre otros. Su principal mecanismo de infección es mediante la producción de esporas, las cuales al germinar se propagan en el insecto o generan compuestos tóxicos que terminan por causar la muerte del insecto blanco (Barocio-Hernández, 2014). Por ejemplo, el lepidóptero del género *Spodoptera* se puede controlar con el entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Este hongo produce enzimas extracelulares que degradan la cutícula del insecto, permitiendo su propagación en el interior, al mismo tiempo que produce toxinas (beauvericina y/o bassianolida) que ocasionan el deceso del lepidóptero (Petlamul & Prasertsan, 2012; Zimmermann, 2007).

Muchos otros hongos cuentan con habilidades antagónicas que les permiten ser fuertes competidores por espacio y nutrientes, además de tener habilidades antibióticas y de micoparasitar organismos por medio de enzimas y metabolitos secundarios. Tal es el caso del hongo *Trichoderma harzianum*, que además de controlar patógenos como el hongo *Rhizoctonia solani*, genera sinergismos con la planta en donde se producen compuestos que promueven el crecimiento vegetal (Martínez et al., 2008; Scherm et al., 2008; Tovar-Castaño, 2008).

Otros promotores del crecimiento son los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), simbiontes obligados de la mayoría de las plantas, que facilitan la absorción de nutrientes, aumenta su zona radical, además de brindar mayor resistencia ante sequías y hongos patógenos como *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* (Alarcón et al., 2004; López-Carmona, 2013).

#### **2.4 Interacción entre grupos funcionales de microorganismos**

En la actualidad existen diversas investigaciones que han buscado aumentar el conocimiento de las interacciones entre los diversos microorganismos benéficos del suelo para su aprovechamiento. Sin embargo, aún hace falta información que contribuya con la

comprensión de su funcionamiento y de las interacciones entre los diferentes grupos funcionales de microorganismos benéficos.

Investigaciones como la de Martínez-Medina et al. (2011), muestran que el hongo antagonista y biofungicida *T. harzianum* en interacción con promotores del crecimiento del género *Glomus* pueden contribuir de manera significativa en la relación tallo/raíz de las plantas de melón. Su coinoculación dio lugar a una incidencia mucho menor de las enfermedades causadas por el hongo patógeno *Fusarium oxysporum*. El control biológico se dio a partir de la modificación del perfil hormonal de la planta por parte de los dos microorganismos y no solo por las capacidades antagónicas de *T. harzianum*. Por otro lado se tienen datos de que en plantas de maíz, las poblaciones, las capacidades antagónicas y promotoras del crecimiento de *T. harzianum* disminuyen en presencia de HMA (Mar-Vázquez et al., 2000).

En otro estudio realizado por Krauss et al. (2004), se buscó conocer el tipo de interacción entre entomopatógenos y micoparásitos, dentro de los cuales se encuentran *B. bassiana* y *T. harzianum*, microorganismos que según este estudio al interactuar no se ven afectados uno al otro, por lo que su aplicación conjunta no afecta sus características funcionales. Sin embargo, en estudios *in vitro* más recientes se sugiere que la aplicación combinada de *T. harzianum* con *B. bassiana* no es viable, debido a que las habilidades antagonistas de *Trichoderma* generan una fuerte competencia por espacio y nutrientes (Barocio-Hernández, 2014).

Estas habilidades antagónicas pueden causar un desequilibrio microbiológico en los suelos si no son manejadas correctamente, y de igual forma puede suceder con las características funcionales de los entomopatógenos y los promotores del crecimiento (Borrero & Silva, 2005).

De aquí la importancia de investigar más a fondo las interacciones entre los microorganismos del suelo utilizados para diversos fines agrícolas y de esta manera hacer un uso correcto de sus características sin comprometer los procesos biogeoquímicos del agroecosistema.

## 2.5 Características generales de los hongos estudiados

Existen numerosas especies de hongos benéficos utilizados como alternativa a las prácticas convencionales de la agricultura, cada uno de estos se ubica en un grupo taxonómico y funcional que determina muchas de sus habilidades y su papel dentro del agroecosistema. En el caso de muchos de los hongos entomopatógenos, antagonistas y algunos promotores del crecimiento se encuentran dentro de la división *Ascomycota*, mientras que otros como los HMA se localizan dentro de la división *Glomeromycota* (Hibbett et.al., 2007; McLaughlin et al., 2009).

La identificación de los microorganismos benéficos se puede realizar a partir de su caracterización morfológica o de su análisis filogenético de ADN. Con la primera se observan fácilmente estructuras como el micelio (hifas), conidios, conidióforos, arbuscúlos y vesículas, además de su coloración, esporulación, crecimiento y su diferencia con otros hongos. Mientras que con el análisis filogenético del ADN se busca las diferencias en la estructura del ADN, permitiendo identificar de manera más detallada los taxones y linajes correspondientes de cada microorganismo (Berlanga-Padilla, 2006; López-Carmona, 2013).

Las principales estructuras morfológicas son:

- Hifa- Estructura vegetativa filamentosa cilíndrica, característica de algunos hongos; puede ser septada o cenocítica.
- Conidióforo-Hifa simple o ramificada que sustenta conidios a diferencia de las somáticas. Se generan en las células conidiógenas, las cuales pueden disponerse de diversas maneras.
- Conidio- Espora asexual inmóvil formada en el ápice o a un lado de la célula esporógena especializada, se puede generar a partir de células hifales preexistentes o células conidiógenas o esporógenas. Se encuentran regularmente en hongos de las divisiones *Zygomycetes*, *Ascomycetes* y algunos *Basidiomycetes*.
- Arbúsculos- Nombre dado al conjunto de hifas en forma de árbol, característica de los HMA. Es la estructura típica de la simbiosis entre la planta y el hongo.

- Vesículas- Tiene forma ovalada o esférica; puede formarse dentro o fuera de las células radicales y funciona como almacén de nutrientes. Se encuentran presente en los HMA.

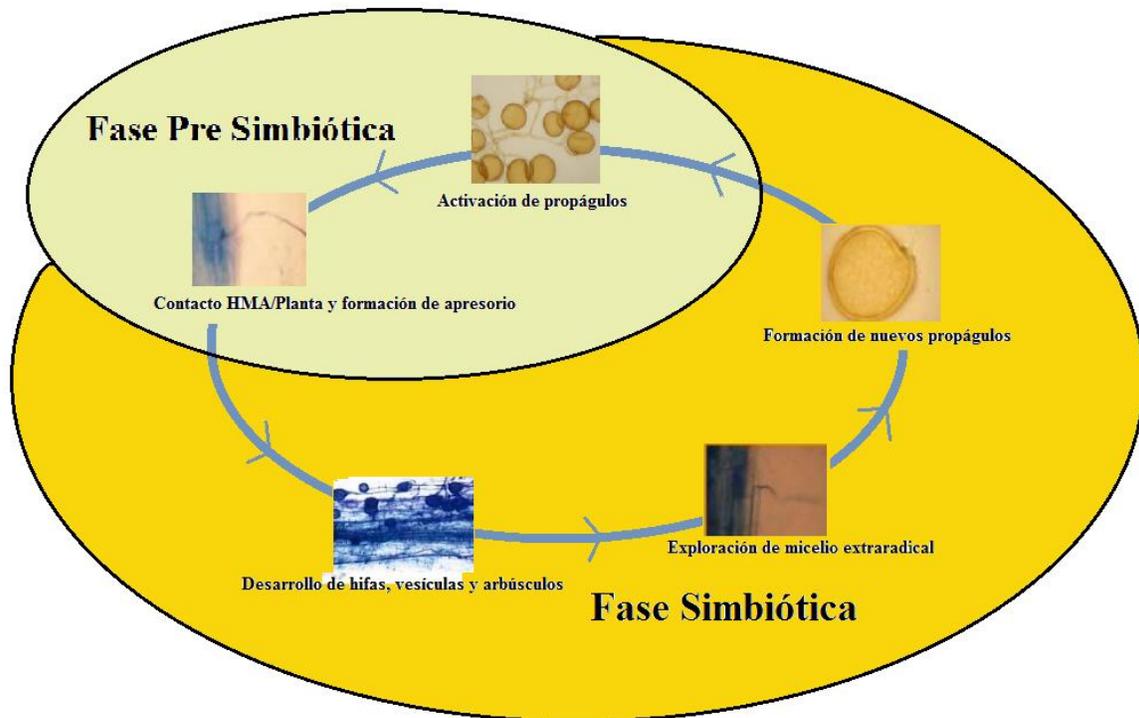
### **2.5.1 *Rhizophagus irregularis***

Es un HMA que pertenece al Phylum *Glomeromycota*, que se caracteriza por no tener reproducción sexual conocida y estar obligado a generar simbiosis para su establecimiento. Simbiosis que se hace presente aproximadamente en el 90% de las plantas terrestres y 80% de las plantas vasculares (Brundrett, 2009; Smith & Read 2008).

Esta especie anteriormente conocida como *Glomus intraradices* o *Rhizophagus intraradices*, fue reclasificada en 2010 por Schüßler A & Walker, C., gracias al análisis de ADN. Su estructura funcional está compuesta por hifas, arbusculos, vesículas, micelio externo y ovillos. Estas estructuras están localizadas de manera intracelular y externa a las raíces de la planta hospedera (Smith & Read, 2008).

Su ciclo de vida se divide en dos etapas, la primera corresponde a la fase asimbiótica en la que se germinan los propágulos del sustrato al estar en contacto con la raíz de la planta, para que después las estructuras hifales se den paso por el córtex sin dañar la célula, logrando así el establecimiento inicial del HMA.

La segunda fase es en la que se culmina el establecimiento de las estructuras micorrízicas (arbusculos, hifas, vesículas), las cuales permiten el intercambio de nutrientes minerales y algunos otros efectos positivos con la planta a cambio de compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis. Al término del ciclo, la formación de nuevos propágulos y esporas se reactiva (Fig. 2) (Requena et al., 2007).



**Fig. 2** Ciclo de vida de los hongos micorrízicos arbusculares, modificado de Requena et al., 2007

Algunas de las características funcionales de este microorganismo, son:

- Promoción del crecimiento y mayor resistencia a condiciones de estrés.
- Protección de las raíces contra patógenos.
- Aumento en la solubilización y absorción de nutrientes minerales.
- Mejoramiento del sustrato.
- Aumento en la asimilación de CO<sub>2</sub>.
- Cambio en la bioquímica e inmovilización de metales pesados.

Ejemplo de estas funciones es la generación de micelio externo, lo que permite explorar un mayor volumen del sustrato que combinado con sus enzimas contribuye al transporte y solubilización de los nutrientes. Lo anterior mejora el intercambio entre huésped y hospedero, aumenta la colonización y contribuye con el aumento en la resistencia al estrés hídrico (Bolan, 1991; Boomsma & Vyn, 2008). Por otro lado, también puede modificar el perfil hormonal, permitiéndole así generar defensas contra patógenos como *Fusarium*

(Martínez-Medina et al., 2011). Ejemplos individuales como estos existen muchos, por lo que adentrarse cada vez más en su entendimiento contribuye al mejoramiento en su utilización comercial dentro del agroecosistema.

### **2.5.2 *Trichoderma* spp.**

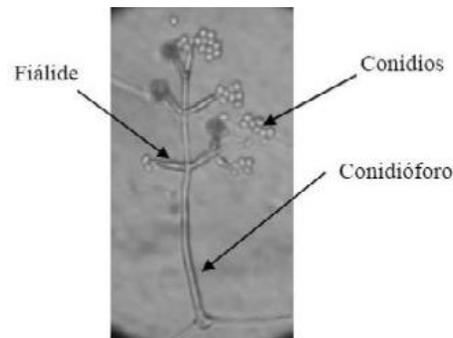
Este género se encuentra dentro de la División: *Ascomycota*, Clase: *Sordariomycetes*, Orden: *Hypocreales*, Familia: *Hypocreaceae*. Se caracteriza por no presentar un estado sexual determinado (Raya-Hernández, 2015). Además de ser un hongo saprófito que se alimenta de la materia orgánica del suelo, habita en el interior de las raíces de las plantas como endófito, de esta manera confiere beneficios tales como la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos (Foty, 2007; García-Núñez, 2010).

Es un hongo anaerobio facultativo, con una gran plasticidad ecológica que le permite desarrollarse en todos los ambientes y latitudes. Es capaz de sobreponerse a las adversidades del medio, gracias a su gran capacidad enzimática para degradar la materia orgánica, crecer y establecerse (García-Núñez, 2010).

Actualmente este género es objeto de interés para la industria y la agricultura, por lo que la producción comercial de sus diferentes especies ha venido en aumento. Algunas especies comerciales son *T. harzianum*, *T. lignorum* var. *narcissi* y *T. narcissi*. Sus funciones se centran en el antagonismo, producción de metabolitos secundarios, promoción del crecimiento, antibiosis, micoparasitismo y en la industria el aprovechamiento de sus enzimas para la producción de productos de consumo humano (Farr & Rossman, 2006; Gashe, 1992; Infante et al., 2009).

Las hifas forman redes que se esparcen rápidamente. Su identificación se puede realizar mediante la observación morfológica de conidióforos cortos y ramificados en forma piramidal con terminación en fiálides, lugar en donde se generan los conidios (esporas asexuales). Los conidios son importantes para la identificación a nivel de especie. Muchas de ellos presentan clamidosporas, que son estructuras de sobrevivencia que permiten al hongo contar con una mayor tolerancia a condiciones ambientales adversas. De manera general en este género podemos encontrar tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y

conidios, además de conidióforos y estructuras fiálides (Fig. 3) (Bailey & Scott, 2004; Infante *et al.*, 2009).



**Fig.3** Conidios y conidióforos de *Trichoderma* spp (Barocio-Hernández, 2014)

Una de las características visuales del género son sus colonias algodonosas, que cubren todo a su paso, con aspecto a un césped difuso y granuloso. Con colores que van desde el verde oscuro hasta tonos más amarillentos que en su periferia tienen mantos blanquecinos (Bailey & Scott, 2004).

Su funcionalidad ha sido comprobada repetidas veces. Por ejemplo, en el control biológico de enfermedades, sus habilidades antagonicas pueden tener efectos como biocontrolador de *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Colletotrichum*, *Pythium* y *Fusarium*, entre otros (González *et al.*, 2002). Mediante la descomposición de la materia orgánica y el aumento de sus poblaciones, especies como *T. harzianum* aumentan la disponibilidad de nutrientes para la planta y brindan metabolitos secundarios como auxinas, giberelinas y citoquininas que estimulan el crecimiento del hospedero (Cubillos-Hinojosa & Valero, 2009; Godes, 2007; Howell, 2003). Habilidades que le confieren una gran importancia económica y biológica para las actividades humanas.

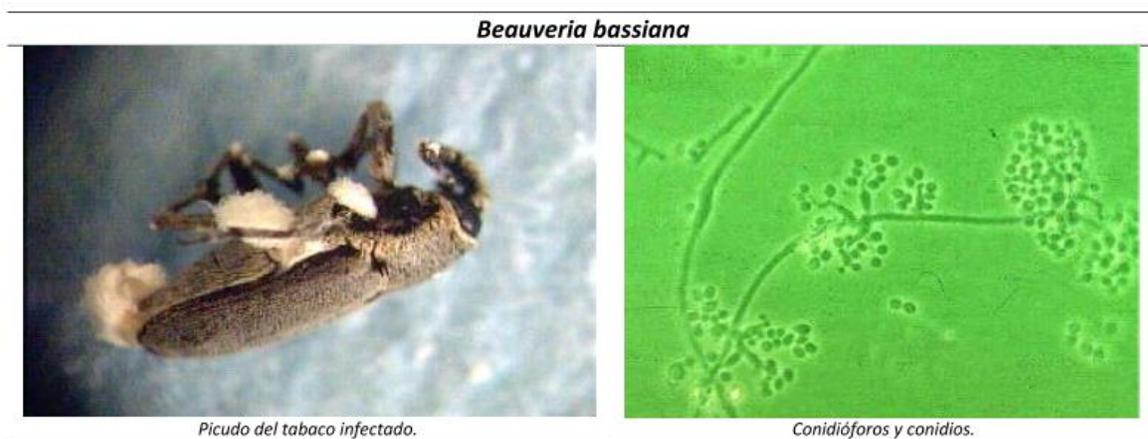
### **2.5.3 *Beauveria bassiana***

Es una especie de hongo entomopatógeno perteneciente a la División: *Ascomycota*, Clase: *Sordariomycetes*, Orden: *Hypocreales*, Familia: *Clavicipitaceae* (Sung *et al.*, 2007). El género se caracteriza por formar conidióforos simples e irregulares que culminan en vértices con forma de racimos, además de tener una apariencia polvosa de color blanquecino o amarillento con textura algodonosa (Ferron, 1981; Humber, 1997).

Su historia se remonta al año de 1835 en el que por primera vez Agostino Bassi di Lodi observó la enfermedad muscardina en el cuerpo de gusanos de seda (*Bombyx mori*). Por lo que en su honor se le dio el nombre del entomólogo italiano (Zimmermann, 2007)

*B. bassiana* no tiene ciclo sexual y forma conidios globosos o subglobosos, con conidióforos formados en racimos compactos. Este entomopatógeno cuenta con una amplia distribución mundial (Humber, 1997). Dentro de su funcionalidad como agente de control biológico resalta su habilidad de producir metabolitos secundarios como beauvericina, bassianina, bassianolida, beauverolidas, tenellina, oosporeina, entre otros. Estos corresponden a toxinas, inhibidores, antibióticos, antivirales, solubilizadores de cutícula y enzimas, entre otros (Zimmermann, 2007).

Sus mecanismos de infección se centran en la unión de los conidios con la cutícula del insecto, los cuales germinan una vez que se encuentran en condiciones de humedad propicias para su desarrollo. Crecen los tubos germinativos, los cuales penetran la cutícula del insecto gracias a las enzimas que degradan las proteínas, quitinas y lípidos de esta, invadiendo al hospedero, el cual muere por la invasión de sus órganos vitales o por la intoxicación producida por los metabolitos secundarios de este hongo (Fig. 4) (Rosas Garcia, 1999; Zimmermann, 2007).



**Fig. 4** Infección producida por *B. bassiana* sobre Picudo del tabaco (*Trichobaris* spp.) y su estructura microscópica (Barocio-Hernández, 2014).

### **3. HIPÓTESIS**

Existen interacciones entre los diferentes grupos funcionales de microorganismos benéficos asociados a la rizósfera en plantas de maíz. Dichas interacciones afectan de diferente manera el desarrollo vegetal, la concentración de nutrientes y la colonización micorrízica de la rizósfera.

### **4. OBJETIVOS**

Explorar los tipos de interacción entre los diferentes grupos funcionales de microorganismos benéficos de la rizósfera, a través del estudio de las interacciones entre cepas comerciales de hongos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus irregularis*), promotores del crecimiento y antagonistas (*Trichoderma harzianum*) y hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*) en plantas de maíz en condiciones de invernadero.

#### **Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la aplicación combinada de *T. harzianum*, *R. irregularis* y *B. bassiana* sobre el desempeño vegetal y concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo).
- Cuantificar el porcentaje de colonización micorrízica de *R. irregularis* en plantas de maíz.
- Establecer el tipo de interacciones entre *T. harzianum*, *R. irregularis* y *B. bassiana*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Material biológico

Para esta investigación se usó maíz híbrido NB9 de una empresa comercial, variedad productora de maíz blanco recomendada para la zona del Bajío. Sus plantas pueden alcanzar los 2.7 m, con un tiempo de floración y cosecha de 80 y 185 días, respectivamente. Su característica principal es una mayor tolerancia a la sequía. Dicha variedad fue seleccionada para reducir el efecto del genotipo y contar con una mayor homogeneidad entre los individuos.

Los microorganismos benéficos utilizados corresponden a tres grupos funcionales de hongos, estos fueron:

- *R. irregularis* (HMA)
- *T. harzianum* (Hongo Antagonista)
- *B. bassiana* (Hongo Entomopatógeno)

Los microorganismos fueron proporcionados por una empresa local en presentaciones de 500 g, formulados en polvo (*T. harzianum* y *B. bassiana*) y en sustrato pre inoculado (*R. irregularis*). Insumos manejados por el laboratorio de Agroecología del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES) de la UNAM campus Morelia.

### 5.2 Pruebas preliminares de calidad en los productos

*T. harzianum* y *B. bassiana* fueron sometidos a evaluaciones de calidad, para asegurar que se encontraran en condiciones óptimas en cuanto a su viabilidad, densidad y pureza. Mientras que para el inóculo de *R. irregularis* se confió en el análisis de calidad de su empresa productora, debido a que su evaluación requiere un mayor tiempo y un procedimiento diferente.

Como indicadores de calidad se usaron los siguientes parámetros:

- Densidad de conidios igual o superior a  $1 \times 10^9$  por mililitro o gramo de producto.
- Viabilidad mayor a 90 %.
- Libre de todo tipo de contaminación (pureza 99.9%).

Determinación realizada bajo las técnicas descritas por Barocio-Hernández (2014).

### **5.3 Elaboración y manejo del sustrato**

El suelo utilizado en los experimentos fue extraído del campo experimental del Centro Regional Universitario de Centro Occidente (CRUCO) ubicado en Morelia, Michoacán. El suelo se mezcló con arena de río en proporción 1:1 con base a su peso seco.

Según la carta edafológica 1:50,000 del (INEGI), el suelo colectado se clasifica como vertisol, es decir un suelo arcilloso con una capacidad de campo del 37.5%, con pH neutro (7.28), bajo contenido de fósforo y alto en materia orgánica y nitrógeno. El análisis de suelo fue realizado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Anexo 1).

La mezcla se esterilizó en autoclave durante una hora después de alcanzar una presión interna de 15 libras y una temperatura de 120°C. Para asegurar la eliminación de cualquier otro microorganismo en la mezcla, se realizó una segunda esterilización bajo las mismas condiciones pasados dos días del primer evento.

#### **5.3.1 Estimación de capacidad de campo (CC) de la mezcla de suelo**

La capacidad de campo (CC) del suelo es el contenido de agua o humedad que puede retener el sustrato, luego de haber sido saturado y dejado drenar hasta que el potencial hídrico se estabilice, término establecido por Israelson & West (1992).

Para su estimación se utilizó el método gravimétrico propuesto por Llorca (2006), que consiste en pesar cinco muestras de 1000 g de mezcla saturada con agua. Posteriormente se secaron dentro de horno de convección a 105° C durante 48 horas continuas.

Para obtener el porcentaje de humedad del sustrato se utilizó la siguiente fórmula:

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

#### 5.4 Condiciones de crecimiento de las plantas

Se sembraron tres semillas de maíz híbrido NB9 en cada una de las macetas de un litro utilizadas durante el experimento, para asegurar la germinación de por lo menos una planta por unidad experimental. El riego se realizó diariamente al 80% de la capacidad de campo de la mezcla de sustrato.

Cuando las plántulas emergieron, se eliminaron las excedentes de cada una de las macetas, dejando solo un individuo por maceta, con el objetivo de reducir la competencia entre plantas.

La fertilización consistió en la aplicación de 25 mg de nitrógeno por semana y 10 mg de fósforo cada dos semanas. Fertilización basada en la formula desarrollada por la University of Western Australia (Tabla 1).

**Tabla 1. Macronutrientes usados para la fertilización de los tratamientos**

Nutrientes	Formula	Concentración g/L	Aplicación	
			mg/Kg de sustrato	mL de solución/ Kg sustrato
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	28.57 (10mg N/mL)	86.2	3.1
Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	43.93 (10mg P/mL)	34.7	1.25

#### 5.5 Diseño experimental

Todos los tratamientos del experimento fueron inoculados con sus respectivos microorganismos a una densidad de esporas igual a 10<sup>6</sup> por cada gramo de suelo. En el caso específico de los tratamientos con *R. irregularis* se usó el 10% del peso del sustrato total, el cual es de 800 g. Es decir que 720 g correspondían a la mezcla de suelo y 80 g al sustrato con el inoculo de HMA. Mientras que en los tratamientos con *T. harzianum* y *B. bassiana* se usaron 0.74 g y 0.168 g respectivamente.

Se estableció un experimento bifactorial en invernadero, con dos fechas de cosecha a las 4 y 8 semanas, en el que se analizó el efecto de la interacción de tres cepas comerciales de

microorganismos benéficos sobre plantas de maíz híbrido NB9. En ambas cosechas se evaluó el desempeño vegetal (altura, peso de materia seca y húmeda en la parte aérea y radical) y colonización micorrízica. En la segunda cosecha se evaluó adicionalmente la concentración de los minerales (Nitrógeno N y Fósforo P) de la parte aérea (Tablas 2 y 3).

**Tabla 2** Diseño experimental

Cosecha	Factor	Clave	Nivel	Tratamientos totales
4 y 8 semanas	<i>R. irregularis</i> (R)	1	Testigo	8
	<i>B. bassiana</i> (B)	2	R	
	<i>T. harzianum</i> (T)	3	B	
		4	T	
		5	R+T	
		6	R+B	
		7	T+B	
		8	T+B+R	
Repeticiones por tratamiento				5
Cosechas				2
Unidades experimentales				80

**Tabla. 3** Distribución aleatoria en invernadero (T=tratamiento Re= Repetición)

4 semanas					8 semanas				
T8Re1	T2Re2	T6Re3	T4Re3	T1Re2	T6Re1	T3Re1	T1Re2	T5Re3	T2Re4
T3Re1	T2Re3	T8Re3	T4Re4	T6Re5	T7Re1	T7Re2	T8Re4	T3Re4	T7Re5
T1Re4	T6Re2	T3Re4	T7Re3	T1Re3	T8Re1	T7Re3	T3Re3	T4Re5	T5Re5
T4Re1	T5Re2	T3Re5	T5Re4	T3Re2	T2Re1	T1Re1	T6Re2	T2Re3	T6Re4
T6Re1	T8Re2	T7Re1	T1Re1	T8Re5	T8Re2	T3Re2	T4Re3	T5Re4	T6Re5
T5Re1	T3Re3	T2Re5	T4Re5	T7Re5	T8Re3	T2Re2	T4Re4	T8Re5	T1Re4
T4Re2	T2Re4	T7Re2	T8Re4	T5Re5	T4Re1	T5Re1	T7Re4	T3Re5	T1Re5
T2Re1	T5Re3	T6Re4	T7Re4	T1Re5	T4Re2	T5Re2	T1Re3	T6Re3	T2Re5

## 5.6 Cosecha y variables

### 5.6.1 Extracción de muestras y evaluación del desempeño vegetal

Cada semana se midió la altura de las plantas de su base a la punta de la hoja más larga. La primera medición fue llevada a cabo en el séptimo día y la última fue hecha antes de cada cosecha.

En ambas cosechas se suspendió un día antes la irrigación para reducir la humedad del sustrato. El procesamiento de las muestras permitió eliminar el sustrato adherido a las raíces de las plantas sacudiendo y enjuagando con agua corriente hasta lograr eliminar la mayor cantidad de suelo.

Al finalizar el procedimiento se cortó la parte aérea y radical, colocándolas en bolsas de papel y plástico respectivamente, para posteriormente evaluar el desempeño vegetal. Mediante la utilización de una balanza analítica, se obtuvo el peso fresco de cada una de las partes de la planta. Posteriormente se secaron dentro de un horno de convección marca Fisher Scientific® durante 48 h a 70°C, pasado este tiempo se midió el peso seco de las muestras en una balanza analítica.

Fue necesario guardar por separado alrededor de 2 g de raíces para la cuantificación de la colonización micorrízica. Se estandarizó la estimación del peso seco de las raíces colocando una submuestra de aproximadamente 3 g en la estufa y posteriormente se extrapoló al peso completo. Para ello fue necesario considerar el peso seco y húmedo de la submuestra y el húmedo total mediante la siguiente fórmula:

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

### **5.6.2 Coeficiente alométrico raíz/tallo**

Esta relación permite conocer la proporción de biomasa acumulada en la raíz con respecto a la parte aérea. Además, explica si existen o no modificaciones fisiológicas originadas por la interacción de los tres microorganismos utilizados (López-Carmona, 2013). Dicha estimación se llevó a cabo mediante la relación directa entre el peso seco de la raíz y el peso seco de la parte aérea.

$$\text{Raíz/tallo} = \frac{\text{Peso seco de raíz}}{\text{Peso seco de tallo}}$$

### **5.6.3 Determinación de nitrógeno total (N) y fósforo total (P) en el material vegetal de la parte aérea de plantas de maíz de 8 semanas**

La cuantificación de nitrógeno y fósforo total de la parte aérea de las plantas se llevó a cabo por el método Micro-Kjeldhal propuesto por Murphy & Riley (1962), dicho análisis se realizó de manera simultánea.

El material vegetal de las muestras fue procesado en un molino con una malla de tamiz N° 40 (0.425mm). Posteriormente fueron homogeneizadas y secadas dentro de un horno de convección durante 24 horas a 70°C antes de la determinación. Después se procedió a moler entre 5 y 10 g de muestra en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino.

#### **Digestión Ácida:**

Se pesaron 0.25 g de cada una de las muestras, material que fue introducido dentro de tubos digestores de 75 ml. Es importante resaltar que se tomó nota de las variaciones en el peso de las muestras, ya que esto permitió mejorar la cuantificación final de N y P.

Adicional a esto se sometieron dos tubos digestores más al procedimiento, estos sin muestra y con mezcla digestora, para poder contar con puntos de referencia dentro de la determinación.

Por motivos de seguridad la digestión fue realizada dentro de una campana de extracción.

A cada uno de los tubos del bloque se le adicionaron 1.1 g de mezcla digestora. Mezcla compuesta por 1 g de CuSO<sub>4</sub> (sulfato cúprico) y 10 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfato potásico)

previamente molidos y homogeneizados en un mortero de ágata, la cual funciona como catalizador de temperatura en la digestión, acelerador de la ruptura de enlaces moleculares y la oxidación de la materia orgánica.

Es indispensable generar una reacción de oxidación dentro de las muestras, por lo que se adicionó 3ml de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30% por 10 minutos. Posteriormente se introdujeron los tubos dentro de la cámara de extracción para agregar 7 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) el cual se encarga de disgregar los compuestos nitrogenados, fosfatos y dióxidos de carbono presentes en la muestra.

Una vez agregados los componentes para la digestión se procedió a colocar los tubos dentro de un bloque digestor, para así aumentar la temperatura gradualmente,  $50^{\circ}C$  cada 20 minutos, hasta alcanzar una temperatura máxima de  $375^{\circ}C$ , que se mantuvieron durante aproximadamente tres horas u obtener una tonalidad blanquecina y una fase líquida transparente. Al término se dejaron reposar por 24 horas.

Pasado el tiempo de reposo se aforó cada uno de los tubos con agua desionizada. Posteriormente, fueron agitados intensamente para obtener una mezcla homogénea. Esta muestra fue filtrada en discos de papel Whatman® de 0.125 mm y almacenada en viales de cristal para su posterior lectura.

La lectura del nitrógeno y fósforo total se realizó mediante diluciones, obtenidas de los extractos homogeneizados obtenidos después de la filtración. Para determinar N es necesario obtener un dilución de 1:50, por lo que se usó 0.1 mL de extracto y 4.9 mL de agua desionizada. En el caso del P se usó una dilución de 1:5, que fue igual a 1 mL de extracto y 4 mL de agua desionizada.

La cuantificación de amonio fue hecha bajo el método colorimétrico en un autoanalizador de la marca Bran Luebbe®, sometiendo las diluciones a una longitud de onda de 660 nm. Para esta cuantificación fue necesaria la absorción de la solución buffer de trabajo, la cual es nitroprusiatosalicilato de sodio [ $(Na_2Fe(CN)_5 NO_2H_2O)$ ], hipoclorito de sodio ( $NaClO$ ), agua y solución de lavado (ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 4%). La determinación de P se realizó de manera similar a la de N, solo que en esta se sustituyó el hipoclorito por Molibdato-Vanadato de Amonio después de la reducción con ácido ascórbico.

Los datos arrojados por el autoanalizador fueron en partes por millón y se transformaron en:

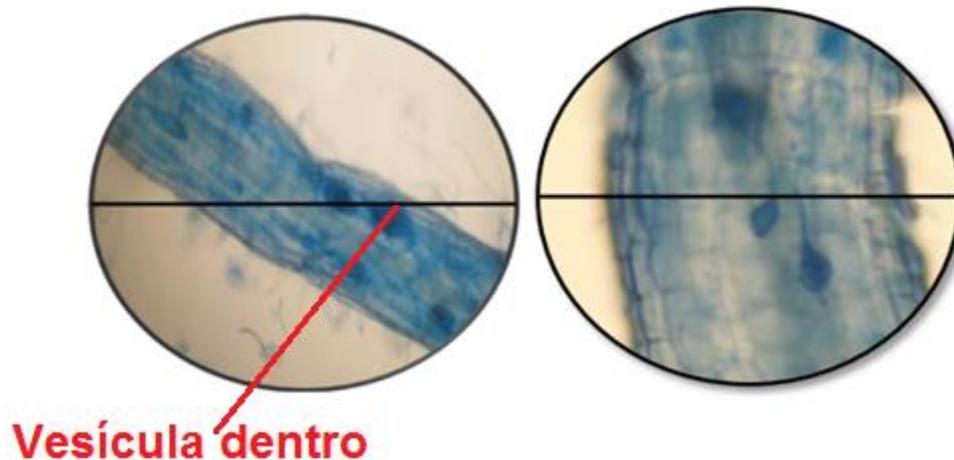
*mg de nutrientes totales/gr de materia seca aérea*

#### **5.6.4 Determinación del porcentaje de colonización de *R. irregularis***

El análisis solo se realizó a los tratamientos con presencia de *R. irregularis* y al testigo sin inocular. Es importante mencionar que en las raíces de los testigos no se encontró una colonización promedio mayor a 1%, por lo que en el análisis estadístico de esas unidades fue excluido. La contaminación de alguno de los tratamientos sin la inoculación de *R. irregularis* se puede atribuir al flujo del viento dentro del invernadero.

Para esta evaluación se tiñeron las raíces mediante la modificación de la técnica propuesta por Phillips & 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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. Una vez procesadas las raíces fueron almacenadas en frascos plásticos con glicerol.

La estimación del porcentaje de colonización de micorrizas fue realizado mediante la modificación de la técnica descrita por McGonigle et al. (1990). Se montaron en un porta objetos 20 raíces de al menos 1.6 cm alineadas paralelamente una con otra. Posteriormente se contabilizaron 100 intersecciones o segmentos de raíz. Se anotó solamente la presencia o ausencia de estructuras micorrízicas (arbuscúlos, hifas, vesículas y micelio externo) en cada uno de los segmentos. Las estructuras solo fueron cuantificadas cuando la línea tocó una estructura, de lo contrario aunque estuviera dentro del campo visual no fue considerada (Fig. 5). Para la determinación se usó un microscopio con contraste de fases Olympus® BX41.



**Fig. 5** Método de estimación de la colonización micorrízica. Modificado de Mc Gonigle et al. 1990.

### 5.7 Análisis estadístico

Las variables de respuesta fueron: altura de planta, peso seco de parte aérea y radical, biomasa total, proporción raíz: tallo, concentración N y P y colonización de micorrizas. Los datos de cada una de estas variables se evaluaron mediante el análisis de homogeneidad de varianza (Levene's  $P > 0.05$ ). Cuando las varianzas de los datos no eran homogéneas, los datos se transformaron logarítmicamente.

Posteriormente se realizaron ANOVA de dos y tres vías para buscar diferencias significativas entre tratamientos, subsecuentemente se llevaron a cabo pruebas de LSD (diferencias mínimas significativas) de rangos múltiples para encontrar diferencias entre medias. Se usó un nivel de confianza del 95%.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Statgraphics Centurion® XV.I, mientras que las figuras de los resultados se diseñaron con el software Sigma Plot 11.0.

Con los resultados obtenidos se realizaron correlaciones entre las variables, para determinar si los efectos tenían alguna conexión entre ellos y con la presencia de las cepas de microorganismos. Se calcularon los coeficientes de correlación usando el software Sigma Plot 11.0.

## 6. RESULTADOS

Se presentan los resultados de las pruebas de calidad y de las variables medidas a las 4 y 8 semanas. La exposición gráfica de los resultados hace especial énfasis en las diferencias significativas obtenidas en el análisis de varianza. En el análisis estadístico del porcentaje de colonización micorrízica se descartaron los tratamientos sin inóculo de *R. irregularis*, con el fin de reducir la variabilidad de los datos.

### 6.1 Pruebas de calidad en los productos

Los resultados de la pruebas de calidad de las cepas usadas en este experimento se expusieron en el trabajo realizado por Barocio-Hernández (2014). Datos de importante valor que permitieron un mejor control de los microorganismos usados durante el desarrollo del experimento.

**Tabla 4.** Control de calidad de bioinoculantes comerciales: hongos entomopatógenos y antagonistas

Especie	Densidad de esporas/gramo reportadas en el producto comercial	Densidad de esporas/gramo observadas en el control de calidad	Viabilidad (%)	Pureza (%)
<i>B. bassiana</i>	$5.3 \times 10^9$	$4.76 \times 10^9$	91.5	98.42
<i>T. harzianum</i>	$1.2 \times 10^{11}$	$1.08 \times 10^9$	9	84.62

Barocio-Hernández (2014).

Como se visualiza en la Tabla 4, la diferencia entre la densidad de esporas reportada en el envase del producto y las observadas en el control de calidad fue minúscula para *B. bassiana*. Caso contrario en los resultados de *T. harzianum*, donde se registró una diferencia de 111 veces menos esporas respecto a las reportadas en el envase del producto. En cuanto a la viabilidad de esporas se encontró que la cepa de *B. bassiana* cuenta con un porcentaje de esporas aceptable para los parámetros de calidad establecidos. No obstante, en el caso *T. harzianum* no sucedió lo mismo debido a que su porcentaje se encuentra muy por debajo de los valores recomendados.

## 6.2 Efecto de la inoculación de tres grupos funcionales de microorganismos benéficos en el desempeño vegetal y colonización de *R. irregularis* de plantas de maíz de 4 semanas

Se evaluó el efecto de la inoculación de tres grupos funcionales de microorganismos benéficos sobre el desarrollo vegetal y la colonización micorrízica de plantas jóvenes de maíz, con el objetivo de usar los valores obtenidos como indicadores de la interacción entre las cepas comerciales y conocer sus efectos individuales.

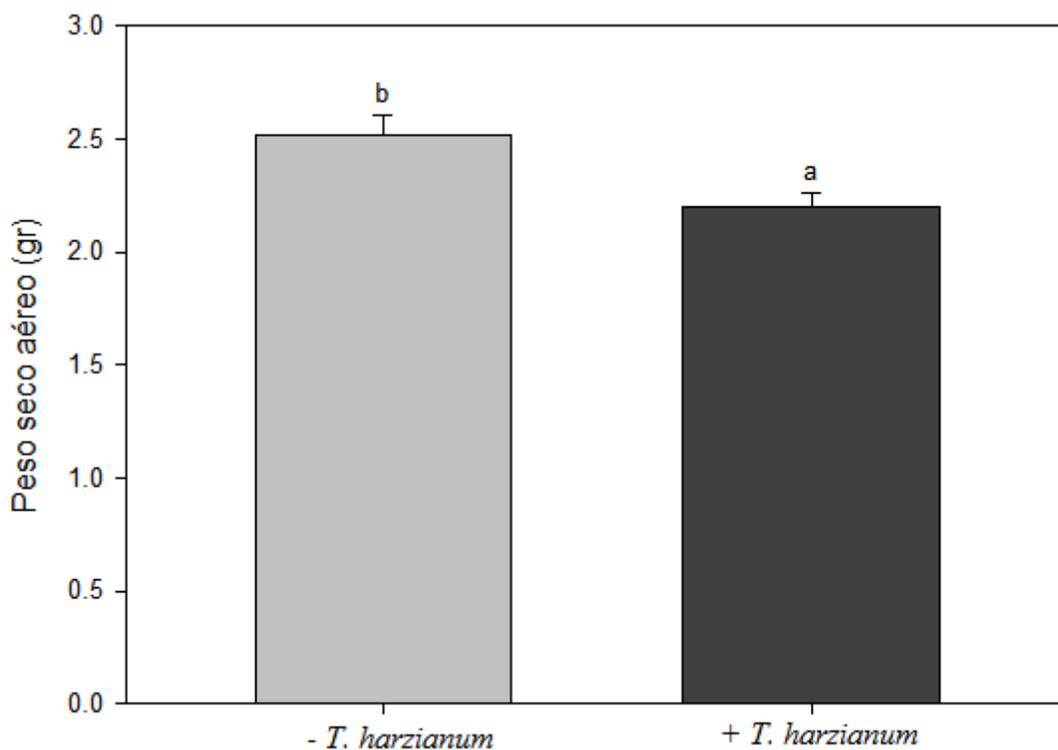
La interacción de *T.harzianum* y *B. bassiana* fue significativa ( $p \leq 0.05$ ) en respuesta al peso seco de la raíz y de la biomasa total de la planta del maíz, por lo que el efecto de cada uno de los microorganismos depende de la presencia del otro. A partir de este resultado se logró detectar la presencia de interacciones entre los microorganismos. En cuanto al peso seco de la parte aérea del maíz (tallo y hojas) existe una respuesta significativa ( $p \leq 0.01$ ) en presencia de *T. harzianum*, mientras que en la relación raíz/tallo el efecto significativo se dio en presencia del factor *B. bassiana*, no se encontró respuesta alguna en el resto de los inóculos. En contraste, la colonización de *R. irregularis* no obtuvo algún valor significativo en ninguno de los tratamientos inoculados (Tabla 5).

**Tabla. 5.** Valores de probabilidad ( $p$ ) del análisis de varianza para el desempeño vegetal y colonización de la raíz de plantas de maíz de cuatro semanas inoculadas con tres diferentes cepas de hongos benéficos  $*=p \leq 0.05$ ,  $**=p \leq 0.01$ .

Factor	Peso seco aéreo	Peso seco raíz	Biomasa total	Raíz/Tallo	Colonización Micorrízica
<i>R. irregularis</i> (R)	0.4786	0.565	0.9726	0.2262	N/A
<i>B. bassiana</i> (B)	0.2392	*	*	*	N/A
<i>T. harzianum</i> (T)	**	0.2998	0.0537	0.3744	N/A
R+B	0.9403	0.235	0.4221	0.1159	0.1326
R+T	0.739	0.7784	0.9815	0.5315	0.218
T+B	0.1696	*	*	0.0572	N/A
R+B+T	0.718	0.5785	0.8518	0.2933	0.1343

### Peso seco aéreo (PSA) y radical (PSR) de plantas

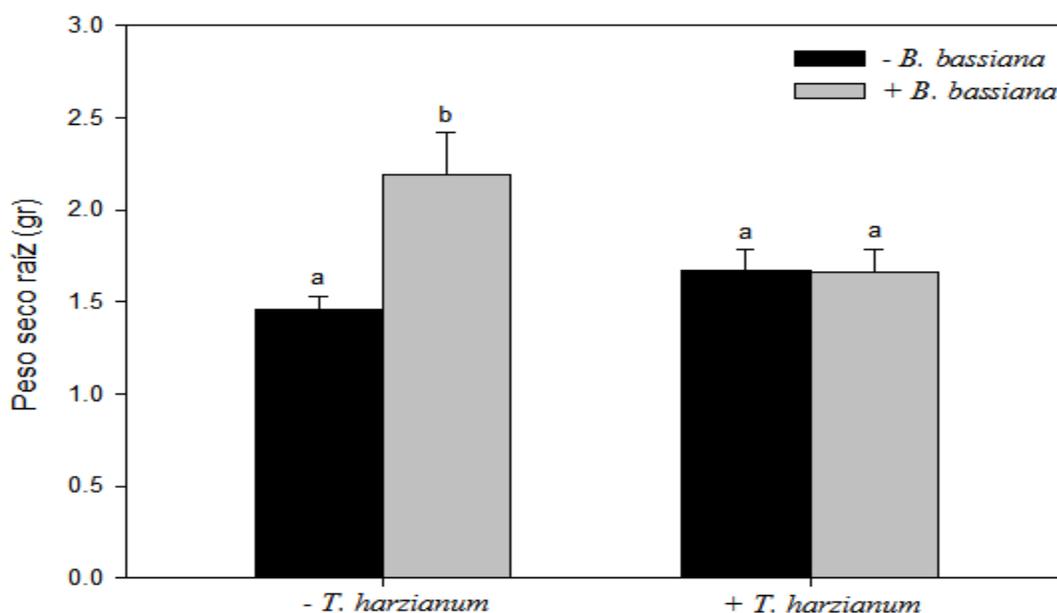
Dentro de esta variable se encontró que la mayor acumulación de peso seco aéreo fue dado por el inóculo individual de *B. bassiana*, teniendo 10% más biomasa aérea que el testigo. Sin embargo, mediante el análisis estadístico del PSA de las plantas de maíz de 4 semanas el efecto significativo estuvo determinado por la presencia de *T. harzianum* (Fig. 6). La inoculación de *T. harzianum* generó una reducción en el PSA del 13% en comparación a los tratamientos sin inocular, efecto de carácter negativo para el desarrollo de la planta en esta etapa, por lo que es importante determinar si esto continuó con el paso del tiempo. No fue posible visualizar alguna otra variación debido a que el resto de los factores no tuvieron especial relevancia en esta variable.



**Fig. 6** Efecto sobre el peso seco aéreo de los tratamientos sin y con *T. harzianum* de la primera cosecha (4 semanas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de  $n=20$  y analizadas con la prueba de LSD.

### Peso seco raíz (PSR)

Los tratamientos inoculados con *B. bassiana* en ausencia de *T. harzianum* presentaron un aumento en el peso seco de la raíz del 50% en comparación con los tratamientos sin la inoculación de estos dos microorganismos. Según el análisis estadístico existe una interacción significativa entre *T. harzianum* y *B. bassiana*, por lo que el efecto de cada uno de estos inóculos está determinado por la presencia del otro (Fig. 7). Los tratamientos con presencia combinada de *T. harzianum* y *B. bassiana* reducen el PSR en 24% con relación a los tratamientos que obtuvieron la mayor biomasa radical. Con las observaciones realizadas se determinó que *B. bassiana* (entomopatógeno) en ausencia de *T. harzianum* genera un efecto benéfico en el desarrollo de la biomasa radical de las plantas de maíz de 4 semanas de desarrollo. Esto nos habla de una interacción negativa entre inóculos, derivada probablemente de los efectos antagonistas de *T. harzianum*. La ausencia de *B. bassiana* no modifica radicalmente los promedios de los tratamientos inoculados con el antagonista.

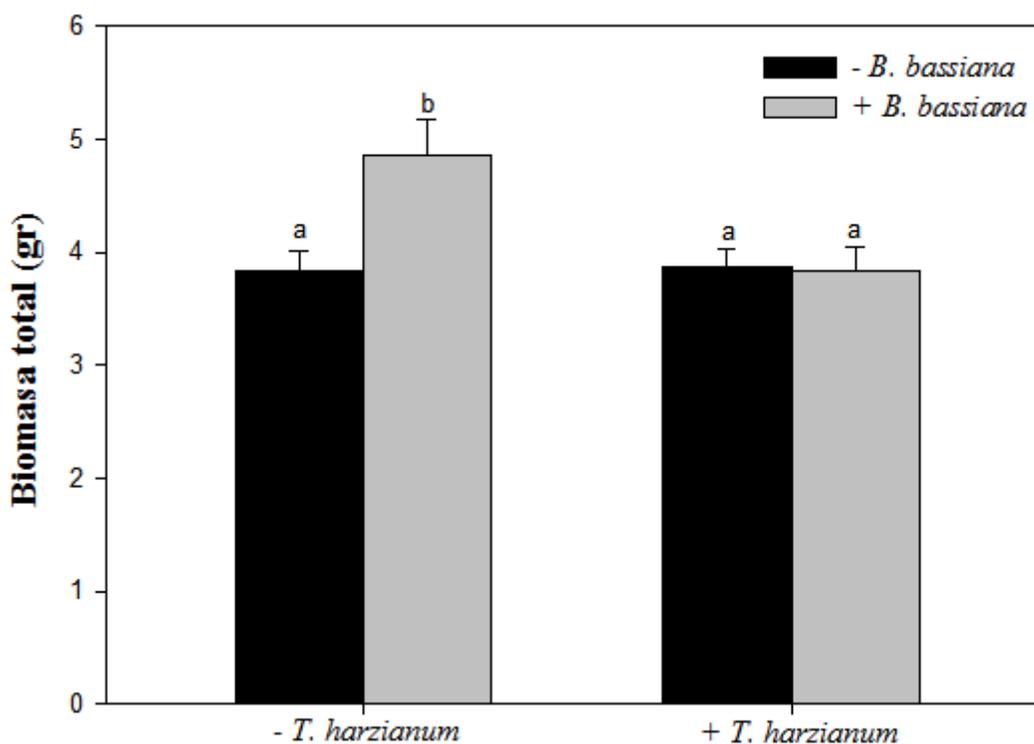


**Fig. 7** Efecto de la aplicación de *B. bassiana* y *T. harzianum* sobre el peso seco de la raíz de la primera cosecha (4 semanas). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de  $n=10$  y analizadas con la prueba de LSD.

## Biomasa total y coeficiente alométrico Raíz/Tallo de la primera cosecha

### Biomasa Total

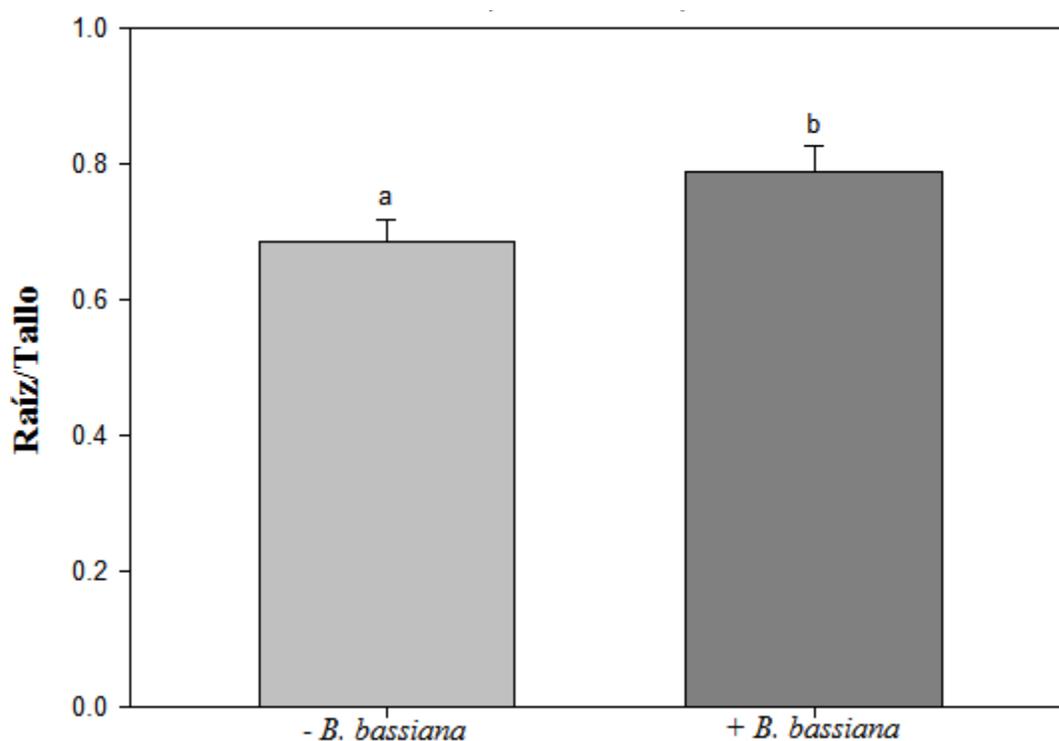
Los tratamientos inoculados con *B. bassiana* en ausencia de *T. harzianum* tienen la mayor acumulación de biomasa total, teniendo un aumento del 27% si se compara con los tratamientos con ausencia de estos dos microorganismos. De igual forma que en el PSR, la interacción de *T. harzianum* y *B. bassiana* fue estadísticamente significativa, teniendo efecto en esta variable (Fig. 8). En este caso los tratamientos con *T. harzianum* no generaron ningún efecto positivo en la biomasa total de las plantas de maíz, indicando una interacción negativa dada por *T. harzianum* sobre *B. bassiana*.



**Fig. 8** Efecto de la aplicación de *B. bassiana* y *T. harzianum* sobre la biomasa total de plantas de maíz de 4 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de  $n=10$  y analizadas con la prueba de LSD.

### Coefficiente alométrico raíz/tallo

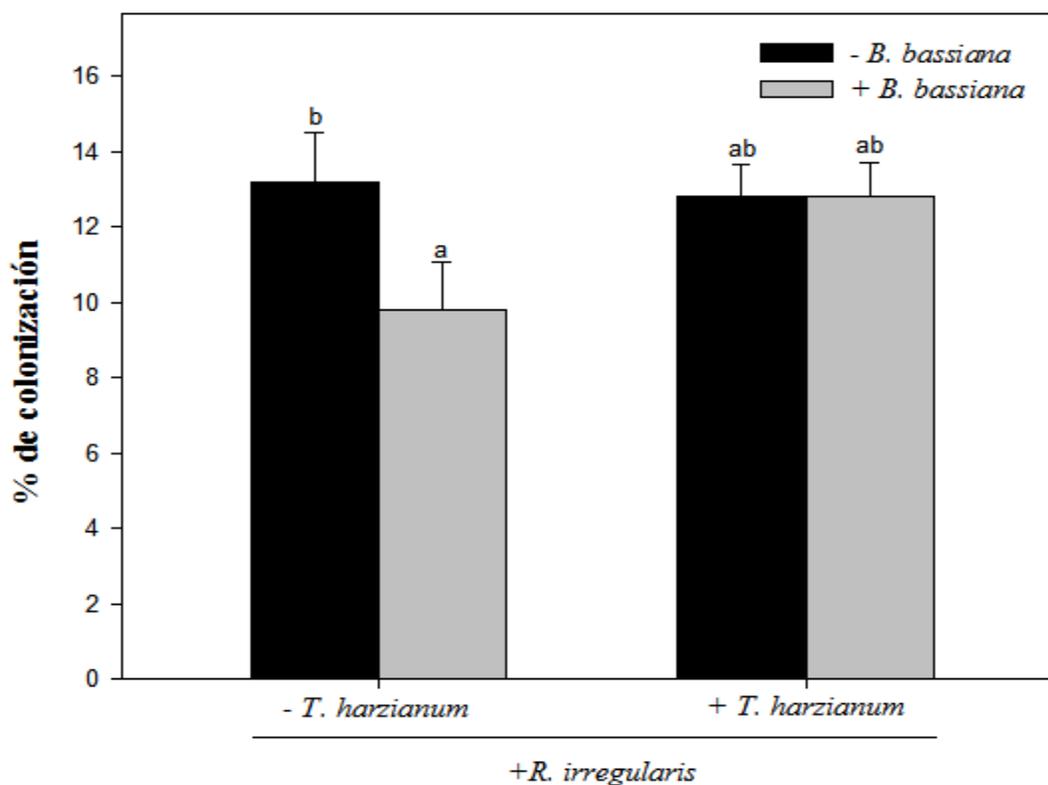
En el análisis estadístico de esta variable se encontró que la presencia de *B. bassiana* es significativa, por lo que los tratamientos con la inoculación de este microorganismo tuvieron un aumento del 15% en comparación a los que no fueron inoculados con el entomopatógeno (Fig. 9). Es decir que la producción de raíz con respecto al desempeño del tallo fue 15% mayor con la presencia de *B. bassiana*, permitiendo un desarrollo más estable. Ninguno de los otros factores ni su interacción definieron alguna diferencia significativa sobre esta variable.



**Fig. 9** Efecto de la presencia de *B. bassiana* sobre el coeficiente alométrico raíz/tallo de maíz de 4 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de  $n=20$  y analizadas con la prueba de LSD.

### Colonización de *R. irregularis*

La inoculación combinada de *B. bassiana* y *R. irregularis* disminuyó en 16% la colonización del hongo micorrízico arbuscular con respecto al tratamiento inoculado únicamente con *R. irregularis* (Fig. 10), lo que confirma la existencia de una interacción negativa dada por *B. bassiana*. Dicho efecto no se hizo presente cuando *B. bassiana* se encontraba en interacción con *T. harzianum*, por lo que el efecto negativo se contrarresta con esta combinación, definiendo así una interacción positiva en pro de la colonización de *R. irregularis*. El efecto negativo por parte de *B. bassiana* no se visualizó en el análisis de varianza de dos vías debido a que el estadístico se centra en la búsqueda de diferencias significativas dadas por los microorganismos sobre la colonización *R. irregularis*. La diferencia solo es visible cuando se comparan los tratamientos por separado.



**Fig. 10** Efecto de la inoculación de cepas comerciales de hongos benéficos sobre la colonización de *R. irregularis* de plantas de maíz de 4 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de  $n=5$  y analizadas con la prueba de LSD.

### **6.3 Efecto de la inoculación de tres grupos funcionales de microorganismos benéficos en el desempeño vegetal, concentración de nutrientes y colonización de *R. irregularis* en plantas de maíz 8 semanas**

En este apartado se evaluó el desempeño vegetal y la colonización de *R. irregularis* tal como en la primera cosecha. Adicionalmente se agregó el análisis de concentración de nutrientes del tallo (Nitrógeno N, Fósforo P). Las determinaciones fueron usadas para visualizar los efectos de la inoculación de los tres hongos benéficos sobre las plantas de maíz en un tiempo mayor al observado en la primera cosecha.

En cuanto a desempeño vegetal se refiere, la segunda cosecha permitió la obtención de datos totalmente contrastantes a los encontrados en la primera cosecha. Ejemplo de esto fue la primera y única interacción entre los tres factores, *B. bassiana*, *T. harzianum* y *R. irregularis*. Dicha interacción se encontró en el peso seco de la parte aérea (PSA) del maíz de 8 semanas, con un valor significativo ( $p \leq 0.05$ ). El efecto sobre el PSA depende de la presencia o ausencia de cada uno de estos tres microorganismos. Por lo tanto el tipo de interacción se determina a partir de una interpretación más minuciosa que en las interacciones dobles.

En el resto de las variables de desempeño vegetal se observó que la interacción de *R. irregularis* y *B. bassiana* genera un efecto estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) sobre el peso seco de la raíz (PSR), la biomasa total y el coeficiente alométrico Raíz/Tallo (Tabla 6).

**Tabla. 6.** Valores de probabilidad ( $p$ ) del análisis de varianza para el desempeño vegetal de plantas de maíz inoculadas con tres diferentes cepas de hongos benéficos en un experimento de 8 semanas.  $*=p \leq 0.05$ ,  $**=p \leq 0.01$

Factores	Desempeño vegetal			
	Peso seco aéreo	Peso seco raíz	Biomasa total	Raíz/Tallo
<i>R. irregularis</i> (R)	0.079	0.3842	0.7829	0.1188
<i>B. bassiana</i> (B)	*	0.3675	*	0.9783
<i>T. harzianum</i> (T)	0.6724	0.3363	0.5818	0.2901
R+B	0.4299	*	*	*
R+T	0.2865	0.6369	0.8375	0.3565
T+B	0.2483	0.62	0.8137	0.2203
R+B+T	*	0.6096	0.2392	0.0577

#### **Análisis estadístico de la Concentración de nutrientes en la parte aérea (nitrógeno N y fósforo P) y colonización de *R. irregularis***

Se analizó estadísticamente la concentración de Nitrógeno y Fósforo en la parte aérea del maíz, y el desarrollo de *R. irregularis* en la zona radical, información que se observa en la Tabla 7.

En el caso específico del N se obtuvo un valor significativo ( $p \leq 0.05$ ) en la interacción de los inóculos *T. harzianum* y *R. irregularis*, lo que determina la concentración del nutriente según la presencia de cada uno de estos microorganismos. Mientras tanto, en la concentración de P la inoculación individual de *R. irregularis* generó un resultado contundente en su concentración en la parte aérea ( $p \leq 0.0001$ ).

Por otro lado, se obtuvo que los microorganismos *B. bassiana* y *T. harzianum* presentaron valores significativos ( $p \leq 0.05$ ) sobre la colonización de *R. irregularis* en la raíz de plantas de maíz de 8 semanas. En la segunda cosecha se observó una mayor presencia de valores significativos por parte de *R. irregularis* en comparación a la primera cosecha.

**Tabla. 7.** Valores de probabilidad ( $p$ ) del análisis de varianza para la concentración de macronutrientes en la parte aérea y la colonización de la raíz de plantas de maíz inoculadas con tres diferentes cepas de hongos benéficos en un experimento de 8 semanas  $*=p \leq 0.05$ ,  $****=p \leq 0.0001$

Factor	N	P	Colonización <i>R. irregularis</i>
<i>R. irregularis</i> (R)	0.5419	****	N/A
<i>B. bassiana</i> (B)	0.7272	0.6558	N/A
<i>T. harzianum</i> (T)	0.0989	0.2003	N/A
R+B	0.2293	0.4971	*
R+T	*	0.3549	*
T+B	0.6538	0.6373	N/A
R+B+T	0.7144	0.4342	0.1626

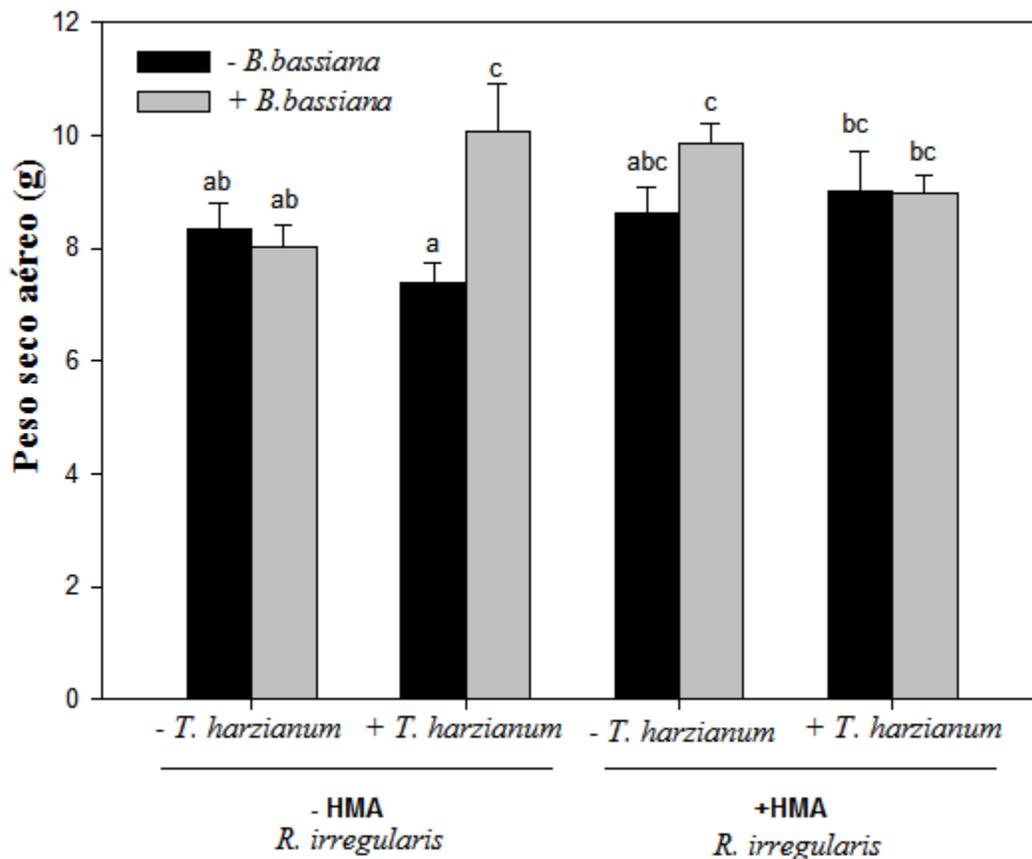
## **Efectos de los microorganismos benéficos sobre el peso seco aéreo (PSA) y de la raíz (PSR) de 8 semanas**

En el caso específico del peso seco aéreo se encontró que en el análisis estadístico de cada uno de los factores tenía influencia sobre el efecto producido por los otros microorganismos. En otras palabras se presentó una triple interacción.

En la Fig. 11 se observa como los tratamientos inoculados con *R. irregularis* generaron un aumento del 8% en el peso seco del tallo con respecto a los tratamientos sin inocular. Aunque existente, este incremento es estadísticamente irrelevante, sin embargo, nos ayuda a profundizar en las interacciones. En los tratamientos inoculados con *R. irregularis* se observó que en presencia de *B. bassiana* el efecto sobre PSA aumentaba casi en 15% en comparación al tratamiento inoculado únicamente con *R. irregularis*. Mientras que en presencia de *T. harzianum* y en el tratamiento con inóculo de los tres microorganismos, el efecto positivo disminuye. A partir de la prueba de grupos homogéneos se determinó que el rango de datos de los tratamientos inoculados con *R. irregularis* es el mismo, por lo que solo es posible determinar que existe un efecto entre *T. harzianum* y *R. irregularis*, pero aún no es posible determinar el carácter de esta interacción.

Por otro lado, comparando los tratamientos sin presencia de *R. irregularis* encontramos que los tratamientos con inóculo individual de *B. bassiana* y *T. harzianum* presentan valores por debajo de los obtenidos con el testigo sin inocular, por lo que sus efectos son negativos. El testigo y los inóculos individuales pertenecen al mismo grupo de datos según la prueba de grupos homogéneos, este conjunto presenta los valores más bajos de la variable. Por lo tanto los valores expuestos indican que cualquier combinación de las tres cepas comerciales usadas genera un aumento en el PSA de las plantas de maíz. Por ejemplo, el tratamiento inoculado con *T. harzianum* (T) y *B. bassiana* (B) de manera simultánea presenta valores 20%, 36% y 26% mayores a los obtenidos en el testigo y en los inóculos individuales de *T. harzianum* y *B. bassiana*, respectivamente. El efecto demuestra una interacción positiva entre dos grupos funcionales muy diferentes. Este valor positivo se reduce a 11% con la inoculación de los tres microorganismos, aunque continúa siendo un 7% mayor que el testigo, confirmando así que la interacción entre *T. harzianum* y *R. irregularis* es de carácter negativo si es comparado con las otras combinaciones. El efecto se disipa al

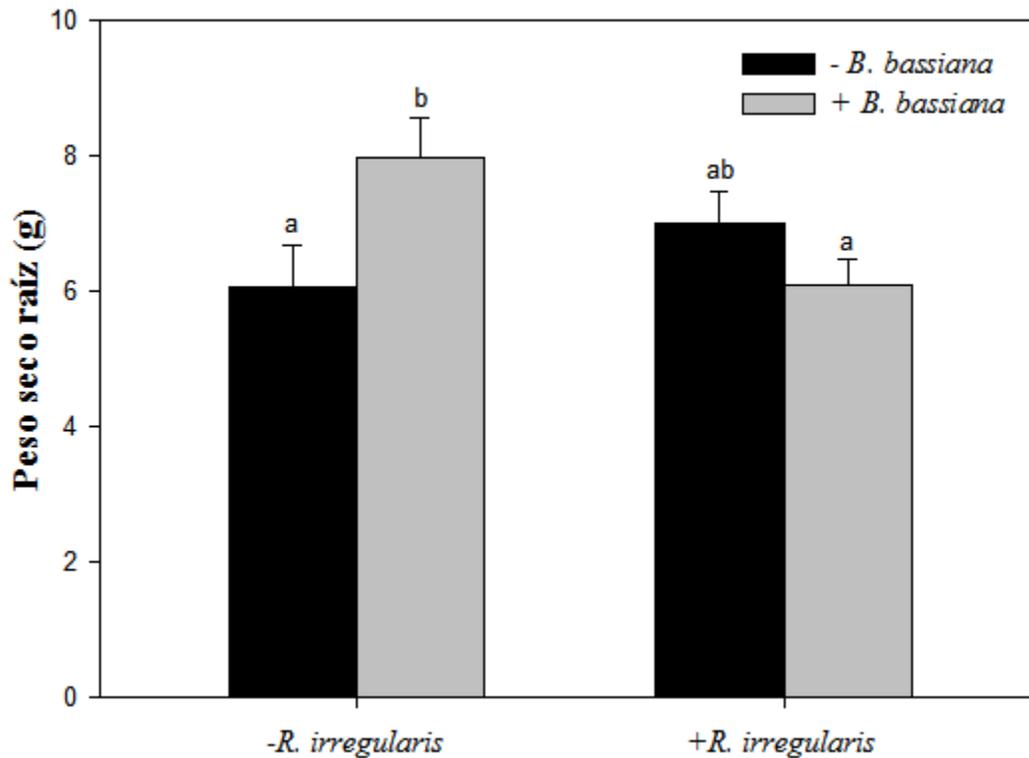
remover *T. harzianum* ya que la combinación de *B. bassiana* y *R. irregularis* tiene 18% más PSA que el testigo. Los resultados confirman que la inoculación del entomopatógeno *B. bassiana* es compatible con los microorganismos *T. harzianum* o *R. irregularis*, ya que genera efectos positivos en el desarrollo del tallo. Mientras tanto *T. harzianum* y *R. irregularis* se inhiben aunque no de una manera significativa.



**Fig. 11** Efecto de la aplicación de *B. bassiana*, *T. harzianum* y *R. irregularis* sobre el peso seco aéreo de la cosecha de plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de  $n=5$  y analizadas con la prueba de LSD.

### Peso seco de la raíz

Se encontró que la biomasa radical se vio afectada principalmente por la presencia de dos factores en interacción, *R. irregularis* y *B. bassiana*. En la Fig. 12, es posible observar que existe una interacción de carácter negativo entre los dos microorganismos antes mencionados. Se percibe que los tratamientos con presencia única de *B. bassiana* sin la inoculación de *R. irregularis* presentan un valor promedio de 13% más biomasa radical que el testigo y que los tratamientos con la inoculación de los dos microorganismos de esta interacción. *Beauveria bassiana* reduce su efecto con la presencia de *R. irregularis*, sin embargo ocurre algo similar pero en menor medida por parte de *B. bassiana* sobre *R. irregularis*.

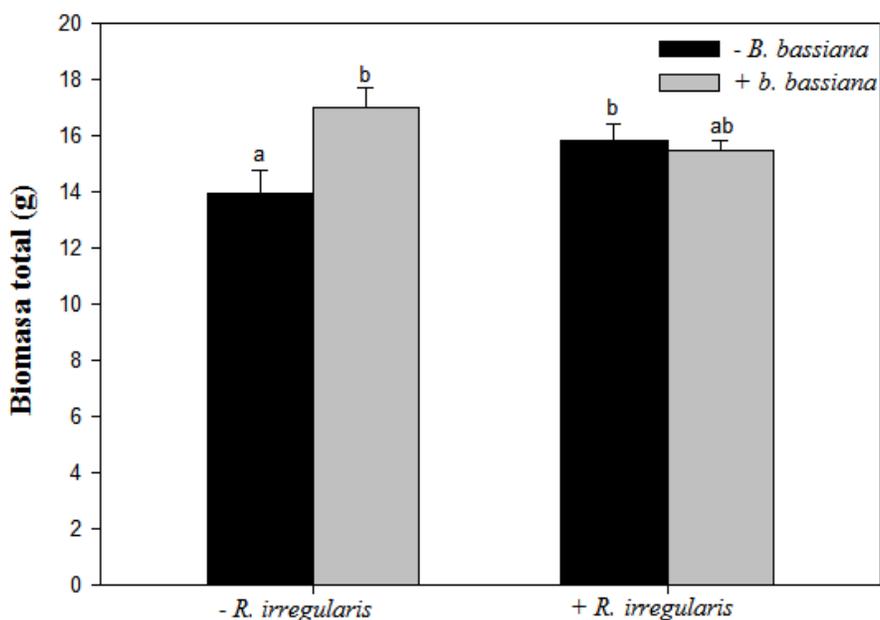


**Fig. 12** Efecto de la aplicación de *B. bassiana* y *R. irregularis* sobre el peso seco de la raíz de plantas de maíz de 8 semanas. Barras de error estándar estimadas a partir de n=10 y analizadas con la prueba de LSD.

## Efecto de los microorganismos benéficos sobre la biomasa total y el coeficiente alométrico Raíz/Tallo de la segunda cosecha

### Biomasa total

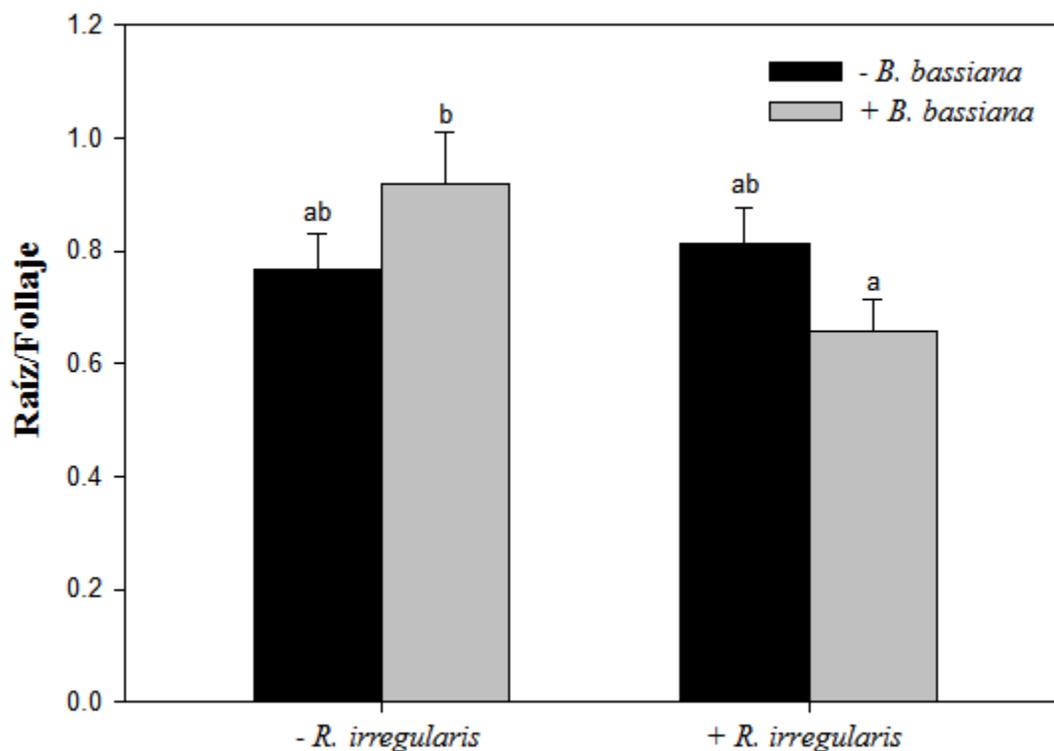
Se obtuvo que a las 8 semanas de desarrollo la inoculación de *R. irregularis* y *B. bassiana* de manera conjunta en los tratamiento aumenta en 11% la biomasa total en comparación a los tratamientos sin su inoculación. Sin embargo, la prueba de grupos homogéneos determina que su rango de datos se encuentra dentro del mismo grupo que el del testigo, por lo que no existe una diferencia relevante. No obstante, los tratamientos con presencia separada de *R. irregularis* y *B. bassiana* tienen un efecto notablemente positivo con respecto a los tratamientos sin su inoculación. En el caso de *B. bassiana*, se obtuvo un 22% más biomasa que el testigo, mientras que *R. irregularis* aumenta esta variable en 13% aproximadamente. La interacción entre *B. bassiana* y *R. irregularis* puede ser de carácter negativo, ya que los valores obtenidos se asemejan a los del testigo, sin embargo no hay diferencias significativas que lo demuestren (Fig.13).



**Fig. 13** Efecto de la aplicación de *B. bassiana* y *R. irregularis* sobre la biomasa total de plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de  $n=10$  y analizadas con la prueba de LSD.

### Coefficiente alométrico raíz/tallo

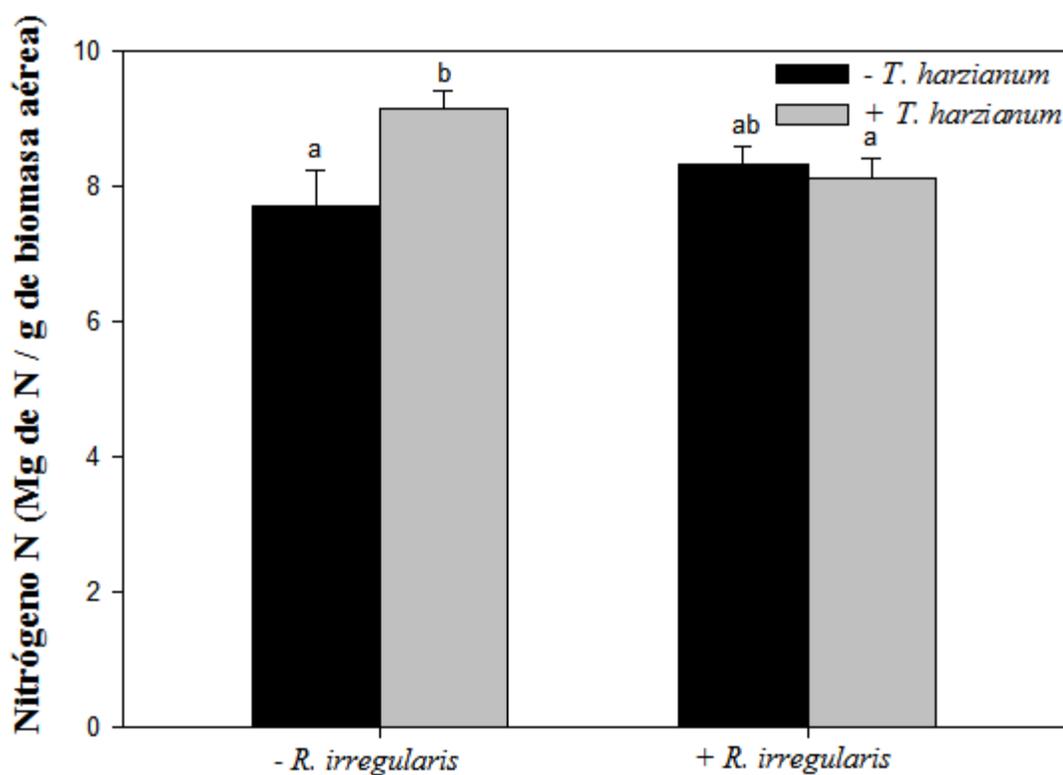
La presencia combinada de *R. irregularis* y *B. bassiana* en los tratamientos del experimento disminuyen en 15% el valor del coeficiente de la raíz con respecto al tallo, en comparación con los tratamientos sin presencia de alguno de los inóculos. Por otro lado, se observó que el efecto se estabiliza una vez que los factores *B. bassiana* y *R. irregularis* se separan, haciendo que el desarrollo tanto de la parte aérea como de la parte radical sea 20% más estable en los tratamientos con presencia de *B. bassiana* y ausencia de *R. irregularis* con respecto al testigo. Es decir que la interacción entre estos dos microorganismos es de carácter negativo para la variable (Fig. 14).



**Fig. 14** Efecto de la aplicación de *B. bassiana* y *R. irregularis* sobre el coeficiente alométrico raíz/tallo de plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de  $n=10$  y analizadas con la prueba de LSD.

### Concentración de Nitrógeno y Fósforo en la parte aérea de plantas de maíz

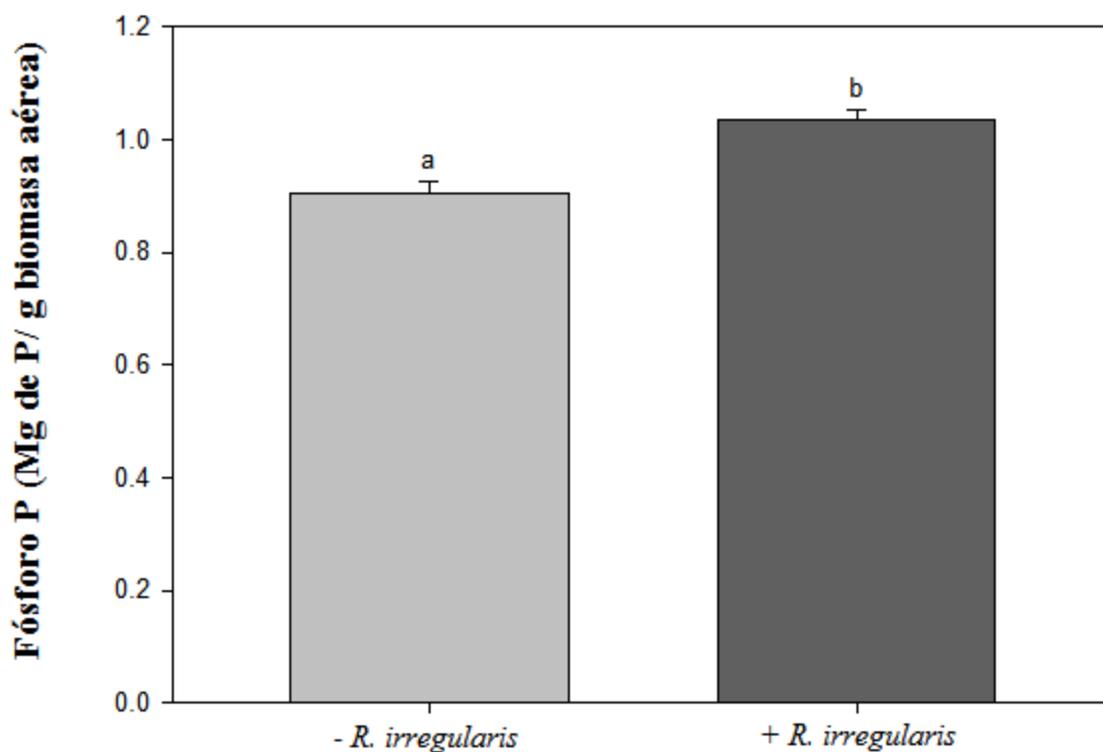
El nitrógeno localizado en la parte aérea del maíz presenta su mayor concentración (9.28 mg N/g biomasa) en los tratamientos con presencia de *T. harzianum* y ausencia de *R. irregularis*. Esto generó una concentración 18% mayor a la obtenida en los tratamientos sin la inoculación de estos dos microorganismos. El efecto se ve reducido en 11% en los tratamientos con presencia combinada de *T. harzianum* y del hongo micorrízico arbuscular. Por lo tanto se observa una interacción negativa entre microorganismos (Fig. 15).



**Fig. 15** Efecto de la aplicación de *T. harzianum* y *R. irregularis* sobre la concentración de nitrógeno en plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas a partir de  $n=10$  y analizadas con la prueba de LSD 0.05%.

## Fósforo

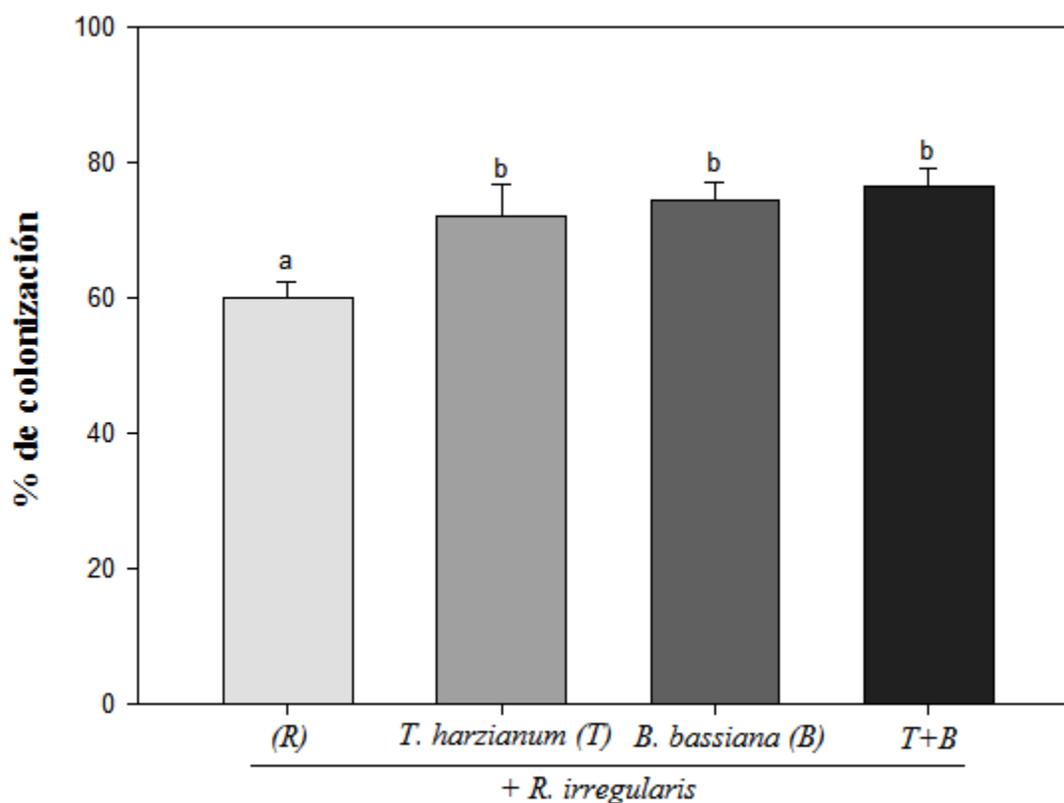
Los tratamientos inoculados con *R. irregularis* tuvieron una concentración de fósforo 14% más elevada que los tratamientos sin inocular. Este factor al ser estadísticamente significativo genera efectos positivos en la concentración de este macronutriente, además de que al no presentar efectos derivados de su interacción con *T. harzianum* y/o *B. bassiana* no existe interacción negativa entre microorganismos (Fig. 16).



**Fig. 16** Efecto de la presencia de *R. irregularis* sobre la concentración de fósforo en plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimadas con una  $n=20$  y analizadas con la prueba de LSD.

### Colonización de *R. irregularis* en la raíz de plantas de maíz de 8 semanas

Se encontraron efectos significativos sobre la colonización de *R. irregularis* dados por *B. bassiana* y *T. harzianum*. Estos efectos son de carácter positivo para el hongo micorrízico arbuscular, debido a que la presencia de estos microorganismos en lugar de limitar su desarrollo lo incrementan de forma considerable. Este beneficio es independiente al tipo de inoculación microbiana (combinada o individual). Cabe destacar que la interacción de los tres inóculos usados durante todo el experimento genera un aumento en la colonización de *R. irregularis* del 20% en comparación al tratamiento con presencia única del hongo micorrízico. *Beauveria bassiana* de igual forma mejora el establecimiento en un 18%, mientras que *T. harzianum* alcanza aproximadamente el 16%, demostrando la existencia de una interacción positiva en su inoculación combinada (Fig. 17).



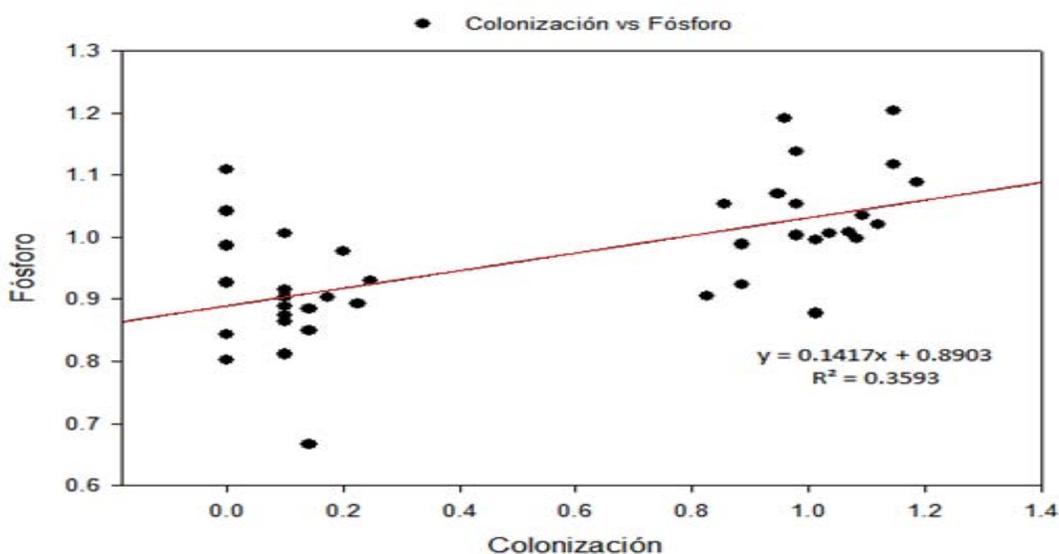
**Fig. 17** Efecto de la inoculación de cepas comerciales de hongos benéficos sobre la colonización de *R. irregularis* de plantas de maíz de 8 semanas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Barras de error estándar estimada con una  $n=5$  y analizada con una prueba de LSD.

#### 6.4 Correlación entre la colonización y el desempeño vegetal

En este análisis la mayoría de las combinaciones obtuvo coeficientes de correlación ( $r^2$ ) inferiores a 0.1 (Tabla 8). Solo la correlación entre *R. irregularis* y la concentración de Fósforo mostró un valor de  $r^2$  de 0.35, el cual indica una correlación débil pero significativa para estas dos variables (Fig. 18). Por lo tanto, se confirma que *R. irregularis* tiene un papel importante en la solubilización y concentración de Fósforo en la rizósfera de las plantas de maíz.

Coeficientes r2	
Colonización-Biomasa	0.002893629
Colonización-Raíz	0.020539794
Colonización-Tallo	0.077777265
colonización-Fósforo	0.359317926
Colonización-Nitrógeno	0.003421629

**Tabla. 8** Coeficientes de correlación entre colonización y desempeño vegetal



**Fig. 18** Coeficiente de correlación de  $r^2$  entre la colonización de *R. irregularis* y la concentración de fósforo de plantas de 8 semanas

## 7. DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó la interacción de tres grupos funcionales de microorganismos benéficos comerciales aplicados a la rizósfera de plantas de maíz. Las interacciones se determinaron por el efecto expresado sobre el desarrollo vegetal del maíz, la colonización de *R. irregularis* y la concentración de nutrientes en la parte aérea de las plantas. De manera general, se encontró que el efecto producido por las cepas comerciales de microorganismos cambia conforme al desarrollo de la planta y a la interacción con los microorganismos. Además en algunas ocasiones el hongo entomopatógeno *B. bassiana* promovió el desarrollo vegetal del maíz por sí sólo y en combinación con el resto de los microorganismos. En esta sección se contrastan y discuten las cosechas realizadas a las 4 y 8 semanas, dividiendo los efectos producidos por los microorganismos sobre las variables evaluadas.

### 7.1 Pruebas de calidad en los productos bioinoculados

Las pruebas de calidad permitieron verificar la información proporcionada por la industria productora de las cepas comerciales de microorganismos. En el caso de *B. bassiana* los valores de calidad son muy cercanos a los expuestos por la empresa productora, determinando buenas prácticas de elaboración del producto y/o de control de la calidad. Mientras que con *T. harzianum*, la densidad de esporas y su viabilidad estuvo muy por debajo de lo expuesto en la etiqueta de su empaque, situación totalmente opuesta a lo observado con el primer microorganismo. Observaciones realizadas por Barocio Hernandez (2014) indican que aunque la densidad de esporas se encuentre muy por debajo de los valores establecidos, las esporas germinadas de *T. harzianum* colonizan y compiten de manera eficiente con microorganismos como *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en experimentos *in-vitro*, efecto que puede estar dado por su alta adaptabilidad al medio y su rápido crecimiento (Borrero & Silva, 2005). No obstante, es de vital importancia que las empresas productoras de estos insumos biológicos distribuyan productos de buena calidad y con información (etiquetado) clara, contribuyendo con el buen uso de estas alternativas agrícolas.

El control de calidad de *R. irregularis* se dificulta debido a que los hongos micorrízicos arbusculares tienen un proceso de establecimiento en la rizósfera de aproximadamente cinco semanas. Al ser un simbiote obligado con las raíces su control de calidad es más lento que el de *T. harzianum* y *B. bassiana* (Klironomos, 2001; Smith & Read, 2008).

## **7.2 Efecto de la inoculación individual y combinada de tres microorganismos benéficos sobre el desarrollo vegetal de plantas de maíz**

### **Peso seco de la parte aérea (PSA) de plantas de maíz**

Se sabe que la biomasa aérea y el área foliar de las plantas son de vital importancia para el funcionamiento y mantenimiento vegetal, ya que es donde se lleva a cabo la fotosíntesis. Estos procesos rigen el crecimiento y el rendimiento del cultivo, además de que pueden determinar la disponibilidad y fijación de carbohidratos y nutrientes (Fassio et al., 1998; Rendón et al., 2012; Uhart & Echeverría, 2002).

A las 4 semanas no se observó ningún efecto producido por la aplicación combinada de *B. bassiana*, *R. irregularis* o *T. harzianum* sobre la parte aérea de las plantas de maíz. Sin embargo, los tratamientos inoculados con *T. harzianum* presentaron una disminución del 13% en el peso seco de la parte aérea en comparación a los no inoculados. Dicho efecto puede estar determinado por la alta velocidad de crecimiento y la plasticidad ecológica de *T. harzianum* (Infante et al., 2009; Otadoh et al., 2011). Lo anterior provoca una mayor colonización e interacción con la rizósfera que a su vez puede aumentar la cantidad de procesos que demandan energía en esta zona, tales como el desarrollo de una mayor superficie de contacto radical producto de la inoculación de *T. harzianum* o el establecimiento simbiótico de los microorganismos (Borrero & Silva H, 2005). Por otro lado este microorganismo puede inhibir por competencia cualquier efecto positivo producido por el resto de las cepas, también se sabe que algunos metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* spp. pueden inhibir el crecimiento de esta variable, uno de ellos fue documentado por Vinale et al. (2008). Sin embargo, en la actualidad existe mayor información sobre los efectos positivos de *T. harzianum*, tal como su habilidad promotora del crecimiento, el aumento en la absorción de los nutrientes en estados tempranos de desarrollo, la producción de metabolitos secundarios y la protección contra patógenos. Se

creo que el efecto negativo sobre esta variable cambia durante el proceso ontogénico del maíz y el establecimiento de las interacciones microbianas (Harman et al., 2004; Otadoh et al., 2011).

A las 8 semanas se observó una mayor influencia de cada uno de los microorganismos sobre el efecto del otro, obteniendo la única interacción triple en el experimento, dejando ver que el efecto de los microorganismos depende directamente del factor tiempo y de la dinámica rizosférica en la que se desenvuelve.

La inoculación individual de *B. bassiana*, *R. irregularis* y *T. harzianum* presentaron valores inferiores a los obtenidos cuando estos están en combinación. La principal disminución en el PSA se encontró en los tratamientos individuales de *B. bassiana* y *T. harzianum*, en comparación con el testigo (6% y 12%, respectivamente). *Trichoderma harzianum* reduce el PSA de manera similar a las 4 y 8 semanas, con la diferencia que a las 8 semanas su inoculación combinada aumenta esta variable. El efecto del tratamiento individual de *T. harzianum* contrasta con los beneficios expuesto por diversos autores, tales como Galeano et al. (2002) en tomate, pepino y pimiento, Harman et al. (2004), Okoth et al. (2011) en maíz y frijol, Ryder et al. (2012) en lechuga y Cubillos-Hinojosa & Valero (2009) en maracuyá. No obstante, los presentes resultados hablan de un efecto negativo en el PSA del maíz de 4 y 8 semanas. Este efecto puede estar determinado por la biología de *T. harzianum*, el desarrollo y consumo desmedido de recursos por la falta de competencia en suelo estéril y/o la cantidad y el tipo de metabolitos secundarios que produce, tales como el metabolito 6PP o el ácido harzianico que actúa como regulador de los mecanismos promotores del crecimiento (F. Vinale et al., 2008; Francesco Vinale et al., 2009). La inoculación combinada de *T. harzianum* con el resto de los microorganismos es posible ya que no causa efectos negativos en esta variable.

En el caso de *B. bassiana* la mayoría de los esfuerzos están enfocados al estudio de sus habilidades como entomopatógeno y controlador de enfermedades, dejando en segundo plano los efectos en el desarrollo vegetal y su interacción con el resto de los grupos funcionales. Una revisión realizada por Zimmermann (2007) indica que después de más de 40 años, el conocimiento de los efectos secundarios o la actividad fitopatógena de *B. bassiana* sobre las plantas no están bien documentados y/o es limitada.

Al igual que *T. harzianum*, el tratamiento con inóculo individual de *B. bassiana* disminuyó el PSA. En algunos estudios se ha encontrado que *B. bassiana* se establece como endófito de algunas plantas, especialmente maíz (Bing & Lewis, 1992; Lewis et al., 2001). Esta interacción puede estar aumentando el consumo de compuestos de carbono, nitrógeno y nutrientes disponibles, para el desarrollo de *B. bassiana*, a cambio de la protección contra patógenos (Johson & Rasmann, 2015; Pham et al., 2009; Safavi et al., 2007; Zimmermann, 2007). El efecto puede ser amplificado por la falta de competencia en suelo estéril, lo que facilita el aumento en su población y el incremento en la demanda de recursos destinados a la rizósfera, afectando así el PSA. Akello et al. (2007), encontraron un efecto similar, el cual atribuyó al método de inoculación directa en el sustrato, enfatizando que con este método se dificulta el contacto de la raíz con los conidios, además de que el riego constante aumenta la pérdida vertical del microorganismo, disminuyendo así la posibilidad de que los efectos positivos generados por estos inóculos se expresen en la planta. Este supuesto se puede aplicar de igual forma a los tratamientos individuales de *T. harzianum* y *R. irregularis*. No obstante, lo propuesto por Akello et al. (2007) no aplica para lo observado en esta investigación, ya que los microorganismos inoculados en conjunto obtuvieron mejores resultados que los tratamientos inoculados individualmente, por lo que el efecto está determinado por la interacción microbiana y no por el método de inoculación.

Los tratamientos inoculados con *B. bassiana* en combinación con *R. irregularis* o *T. harzianum* obtuvieron el mayor incremento en el PSA, seguido por la combinación de *T. harzianum* con *R. irregularis* e incluso la inoculación de los tres microorganismos tuvo efectos positivos en la variable. Resultados similares fueron expuestos por Zitlalpopoca (2015), en donde la inoculación combinada de *B. bassiana* con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) aumenta el desempeño vegetal de plantas de maíz. Se cree que esto se debe a una interacción indirecta entre *B. bassiana* y *R. irregularis*, en donde *B. bassiana* durante las 8 semanas de desarrollo actúa como saprófito y se establece finalmente como endófito, generando una interacción mutualista con la planta, lo que deja una mayor disponibilidad de recursos para el establecimiento de *R. irregularis*, amplificando los efectos positivos de este microorganismo (Zitlalpopoca, 2015; Hoeksema et al., 2010; Owley, 2008).

El efecto dado por la inoculación combinada de *B. bassiana* con *T. harzianum* se atribuyó a procesos similares a los expuestos anteriormente, con la diferencia de que el efecto se amplifica por la producción de metabolitos secundarios y el aumento en la disponibilidad de nutrientes (Vinale et al., 2008, 2009; Windham & Baker, 1986; Zimmermann, 2007). Por lo tanto, la habilidad antagónica de *T. harzianum* sobre *B. bassiana* observada *in-vitro* por Barocio-Hernández (2014) no disminuye el efecto positivo en el PSA de las plantas de maíz en invernadero. Este tipo de resultados resaltan la importancia de realizar experimentos multi-escalares que permitan el desarrollo de información más completa.

La ligera disminución en el PSA producida por *R. irregularis* y *T. harzianum* en comparación a las otras combinaciones, se debe a que estos dos microorganismos compiten por recursos y espacio, además de que pueden modificar la estructura hormonal de la planta generando una disminución en la parte aérea (Martínez-Medina et al., 2010; Sosa et al., 2006; Vinale et al., 2008) Se cree que el efecto negativo producido disminuye con el paso del tiempo.

### **Peso seco de la raíz (PSR) de plantas de maíz**

Las raíces se encargan del abastecimiento de agua y nutrientes, además de que a su alrededor y en ella se originan un sin número de interacciones multitróficas, de las cuales se beneficia y al mismo tiempo se sustenta.

A las 4 semanas se encontró que la interacción de *B. bassiana* y *T. harzianum* era de carácter negativo, efecto atribuido a las habilidades antagonistas de *T. harzianum* sobre *B. bassiana* (Barocio-Hernández, 2014; Vinale et al., 2008). En esta primera cosecha el mayor PSR fue dado por el inóculo individual de *B. bassiana* y en combinación con *R. irregularis*, presuntamente originado por las habilidades saprófitas de *B. bassiana* en su primera etapa de desarrollo, aumentando la disponibilidad de recursos para la planta e incrementando la producción radical que facilita la absorción de los insumos (Dupuy et al., 2010). Dicho efecto contribuye de forma positiva con el desarrollo y establecimiento de *R. irregularis* al no tener una competencia directa y mejorar el medio en el que se desarrollan (Smith & Read, 2008).

A las 8 semanas, la interacción de *B. bassiana* y *R. irregularis* no generó mejoras en la variable, resultado que contrasta con lo observado a las 4 semanas y en el experimento de Zitlalpopoca (2015), en donde se expone que la combinación de estos microorganismos aumenta el PSR de las plantas de maíz. Dicha interacción negativa se puede deber a la disminución de la población de *B. bassiana* en presencia de *R. irregularis* por competencia, lo que disminuye los efectos positivos de *B. bassiana* sobre la raíz de las plantas de maíz (Zimmermann, 2007; Zitlalpopoca, 2015). Sin embargo, la interacción de *B. bassiana* con *T. harzianum* tiene valores positivos que indican una asociación positiva que se consolida con el paso del tiempo.

### **Coefficiente alométrico raíz/tallo y biomasa total de plantas de maíz**

El coeficiente alométrico puede explicar ciertas adaptaciones a estrés ambiental, deficiencias de nutrientes en el suelo o en este caso el efecto de las interacciones en ambas partes de la planta (Goran & Franklin, 2003), mientras que la biomasa total generalmente se relaciona con la salud vegetal y la buena producción agrícola.

El coeficiente alométrico de los tratamientos cosechados a las 4 semanas, mostraron que los tratamientos inoculados con *B. bassiana* tuvieron una producción más estable de la raíz con respecto al tallo, esto en comparación con los tratamientos sin inocular. A las 8 semanas, el efecto de *B. bassiana* se mantuvo, con la diferencia de que este también era bueno cuando se inoculaba en conjunto con *T. harzianum*. No obstante, cuando alguno de estos dos microorganismos se combinaron con *R. irregularis*, se incrementaba en mayor medida la parte aérea con respecto a la radical, efectos similares fueron observados por Zitlalpopoca (2015). La combinación de los tres microorganismos también favoreció en mayor medida la parte aérea que la radical, posiblemente por una mayor actividad microbiana que generó sinergias que proporcionaron más recursos para su desarrollo, ya que los requerimientos de la zona radical están bien abastecidos.

En cuanto a la biomasa total de las plantas de maíz de 4 semanas, se encontró que el inóculo individual de *B. bassiana* y en combinación con *R. irregularis* generó 27% más biomasa total, porcentaje que se ve afectado con la agregación de *T. harzianum*. Esto indica un efecto negativo de este microorganismo sobre *R. irregularis* y *B. bassiana*. A las 8

semanas, la mayor biomasa se observó en el tratamiento individual de *B. bassiana* y en combinación con *T. harzianum*, situación contraria a la observada a las 4 semanas. Gualandi et al. (2014) y Zitlalpopoca (2015) observaron efectos positivos similares en la interacción de *B. bassiana* y *R. irregularis*, al igual que si se inocula con HMA nativos. Sin embargo, el efecto de estos microorganismos en los tratamientos de este experimento cambió con el tiempo, restándole importancia a *R. irregularis* y aumentando la biomasa total en presencia de *T. harzianum*. Krauss et al. (2004) sugieren que la inoculación combinada de *B. bassiana* y *T. harzianum* es posible, además de que contribuye con el control biológico de picudo en plantas de plátano. Por lo tanto, la inoculación combinada de estos microorganismos puede contribuir de manera integral al desarrollo del cultivo. De igual forma la triple interacción podría tener este tipo de efectos a largo plazo, hecho que resalta la importancia de determinar el efecto de las interacciones en etapas posteriores de crecimiento.

Es posible que con el paso del tiempo las interacciones microbianas se establezcan de mejor manera, auto-regulando su desarrollo y generando un equilibrio en las poblaciones microbianas de la rizósfera. También estas interacciones pueden impulsar los efectos positivos de los microorganismos, tales como el aumento de la solubilidad de nutrientes, la producción de metabolitos secundarios, el incremento de la superficie radical, la protección contra patógenos, la resistencia al estrés ambiental y otras funciones que hacen de *T. harzianum*, *B. bassiana* y *R. irregularis* una alternativa sostenible para las nuevas prácticas de manejo en el agroecosistema (Contreras-Cornejo et al., 2014; Zitlalpopoca, 2015; López-Carmona, 2013; Zimmermann, 2007).

Es importante que en los próximos estudios se analice la producción de los metabolitos secundarios y todos los compuestos derivados de la interacción de estos microorganismos benéficos para determinar el rol de cada uno de los microorganismos en presencia de otros. También es relevante comparar los efectos de las interacciones observadas en este experimento en presencia de microorganismos nativos del suelo y en condiciones *in-situ*, para determinar si existen cambios en los efectos producidos (Bais et al., 2006; Zitlalpopoca, 2015). Además, se deben incluir cepas nativas, las cuales están mejor adaptadas a su medio y por tal razón aumentan la posibilidad de incrementar la estabilidad

en la rizósfera y en el agroecosistema (Vinale et al., 2008; Hilda G. García-Núñez et al., 2012).

### 7.3 Concentración de N y P

La concentración de N de la parte aérea fue incrementada por la presencia de *T. harzianum* y su combinación con *B. bassiana*, efecto que se puede atribuir a las habilidades saprófitas de estos microorganismos, que combinada con la producción de metabolitos secundarios facilitan la disponibilidad de los nutrientes (Harman, 2004; Ryder et al., 2012; Zimmermann, 2007). Lo anterior indica una interacción positiva en beneficio de la concentración de N, uno de los principales nutrientes relacionados con el incremento en la producción de los cultivos (Li et al., 2012). Harman et al. (2004) encontró que las semillas de maíz tratadas con T-22 (Cepa de *T. harzianum*) tienen una mejor eficiencia en el uso de nitrógeno, ya que obtuvo el máximo rendimiento con 40% menos fertilizantes nitrogenados. Mientras tanto en el experimento de Zitlalpopoca (2015), *B. bassiana* en combinación con *R. irregularis* generaron una concentración significativa de N, aunque esta no fue mayor que en el inóculo individual de *R. irregularis*.

Por otro lado *R. irregularis* es bien conocido por mejorar la absorción y disponibilidad de nutrientes, sin embargo, se observó que disminuye su efectividad en presencia de *T. harzianum*, aunque lo mismo pasa de manera inversa. Se observó un efecto similar en el estudio realizado por Mar-Vázquez et al. (2000). Otro de los factores que pudo contribuir con la disminución de esta variable en la parte aérea, es que el nitrógeno puede ser retenido por el micelio de HMA dificultando su disposición y translocación a la parte aérea (Hodge & Fitter, 2010). Sin embargo, existen diversos estudios en los que *Trichoderma spp* contribuyen con el desarrollo de simbiontes micorrízicos, lo que a la larga puede tener efectos positivos en el desarrollo y nutrición de la planta (Sosa et al., 2006), Es así como aún no se puede descartar la posibilidad de que la inoculación combinada de *T. harzianum* y *R. irregularis* tengan efectos positivos a largo plazo.

En cuanto a la concentración de P en la parte aérea se encontró que la presencia de *R. irregularis* en cualquiera de los tratamientos mejora su disponibilidad. Es reconocido que el 90% de la absorción de fósforo se atribuye a la presencia de este simbionte micorrízico

arbuscular (Smith & Smith, 2011). Zitlalpopoca (2015) observó un efecto similar en presencia de HMA, lo que confirma la habilidad de estos microorganismos para aumentar la concentración de este macronutriente. Presuntamente se atribuye a que *R. irregularis* influye en los procesos de síntesis de compuestos orgánicos y la solubilización de nutrientes, además de que contribuye al aumento de la superficie de contacto, incrementando la prospección de nutrientes. Además la simbiosis con su hospedero se basa en el intercambio de compuestos de carbono a cambio de fósforo (Kiers et al., 2011; Ronald, 2002). Por otro lado se observó que la interacción de *R. irregularis* con *B. bassiana* y *T. harzianum* no afecta de manera significativa el efecto positivo en la concentración de este nutriente, por lo que su inoculación combinada es favorable para esta variable.

En este estudio solo se consideró la concentración de N y P de la parte aérea, por lo que sería importante en futuros estudios analizar la concentración de nutrientes de la parte radical, lo que permitiría una mejora en la determinación del efecto de las interacciones microbianas sobre la planta.

#### **7.4 Colonización de *R. irregularis***

*Rhizophagus irregularis* requiere de un mayor tiempo de desarrollo que *B. bassiana* y *T. harzianum*. Su establecimiento puede ser afectado por el resto de los microorganismos en las primeras etapas. Esto debe a que puede haber a una mayor competencia por espacio y recursos, además de existir posibles mecanismos de acción basados en antibiosis, fungistasis y micoparasitismos. Tal es el caso de *Trichoderma spp* y posiblemente *B. bassiana* (Mar-Vázquez et al., 2000; Sosa et al., 2006; Zimmermann, 2007). En la primera etapa de este experimento se observó que la presencia de *B. bassiana* generaba un efecto inhibitorio sobre la colonización de *R. irregularis*. Este efecto negativo se modificó a las 8 semanas de desarrollo, donde la inoculación combinada de *R. irregularis* con *T. harzianum*, *B. bassiana* o incluso su triple interacción, maximizaron su colonización. Gualandi et al. (2014) y Zitlalpopoca (2015) presentan resultados similares en los que la inoculación con *B. bassiana* no afecta negativamente la colonización *R. irregularis*, sino que la aumenta, esto mediante mecanismos en los que *B. bassiana* facilita la asignación de recursos a la planta y la planta provee mayor cantidad de compuestos carbonados para *R. irregularis*. En el caso de *T. harzianum*, aunque se conozca como un antagonista y que puede tener efectos

negativos en la colonización de HMA, su efecto no fue el mismo, incluso su combinación con *B. bassiana* y *R. irregularis* promovieron la solubilización de fósforo, lo que aumenta la posibilidad de obtener un buen cultivo.

Por otro lado se conoce que la utilización de HMA contribuye también con el incremento de la resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequia y condiciones de estrés (López-Carmona, 2013), habilidades que pueden ser combinadas con los efectos entomopatógenos de *B. bassiana* y los mecanismos antagonistas de *T. harzianum*. Sin embargo, es importante continuar con los estudios de este tipo para mejorar y confirmar el correcto desarrollo de los efectos benéficos de las interacciones en los cultivos y en especial con los microorganismos nativos.

## 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El uso de microorganismos benéficos para los cultivos representa una alternativa ecológica congruente para el desarrollo de los agroecosistemas y la resolución de los problemas ambientales, razón por la que su estudio debería impulsar la verificación de su viabilidad y seguridad dentro de la compleja red de interacciones en los ecosistemas. Es de vital importancia promover la generación de un conocimiento integral, en donde se logre sintetizar la mayor cantidad de información de diferentes temas de estudios, de manera clara y concreta, con un panorama más amplio que contribuya tanto con la teoría como con la práctica.

En la actualidad el conocimiento sobre las interacciones entre los grupos funcionales de microorganismos es reducido, incrementando la posibilidad de generar un desequilibrio en el ecosistema por un mal manejo. Lo anterior se ve amplificado por la distribución de productos con bajos estándares de calidad, un etiquetado deficiente y/o falta de información sobre las condiciones de almacenamiento del producto. Es importante que el consumidor se asegure de obtener productos de calidad y con información clara, distribuidos por empresas éticamente responsables y comprometidas con la correcta implementación de estas alternativas.

La evaluación de los efectos de la inoculación de *R. irregularis* (R), *B. bassiana* (B) y *T. harzianum* (T) sobre las plantas de maíz híbrido (NB9), permitieron concluir que su combinación contribuye con el mejoramiento en el desempeño vegetal, la concentración de N y P, además de no generar efectos negativos sobre la colonización de *R. irregularis*. De manera global el mejor efecto se observó a partir de la inoculación combinada R+B, seguida por T+B, mientras que los últimos puestos lo obtuvieron R+T y el tratamiento con la combinación de los tres microorganismos. Aunque la triple interacción presento los valores más bajos entre las combinaciones, genero mayores beneficios que la inoculación individual de cada uno de los microorganismos. La interacción de R+T es de carácter negativo por lo que podría estar reduciendo los efectos en esta etapa, además de que con la combinación de los tres microorganismos la competencia por recursos, espacio o incluso la producción de metabolitos secundarios perjudiciales podría aumentar.

Con los resultados obtenidos se observó la existencia de las interacciones mediante los efectos producidos en las plantas. No obstante, hace falta conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales se desarrollan estas, tales como los procesos biológicos, químicos y físicos a través del tiempo. Esto permitiría ampliar el conocimiento de los grupos funcionales de microorganismos y, en caso de que existan cualidades divergentes a las ya conocidas, adaptarlas para mejorar su manejo. Ejemplo de esto son las habilidades promotoras del crecimiento ejercidas por el hongo entomopatógeno *B. bassiana* sobre las plantas de maíz.

Se sabe que *B. bassiana* puede estar presente a lo largo del desarrollo del cultivo. Sin embargo, se cree que su población disminuye con la interacción microbiana, principalmente con HMA. Tal como se mencionó anteriormente, la presencia combinada de *T. harzianum* y *R. irregularis* es de carácter negativo, sin embargo, se cree que con el paso del tiempo estos dos microorganismos pueden generar sinergias en beneficio del cultivo. Se puede concluir que la triple interacción en las primeras 8 semanas de cultivo no generó efectos tan buenos como los observados en cualquier de las otras combinaciones de microorganismos. No obstante, es posible que la triple interacción tenga mayores beneficios a largo plazo, debido a la posible multifuncionalidad de este consorcio microbiano. Esto beneficiaría al mismo tiempo con el incremento en el desempeño vegetal, una mayor concentración de nutrientes en la planta, una mayor protección contra patógenos, el aumento en la resistencia contra factores de estrés biótico y abióticos e incluso encontrar algún efecto no documentado hasta el momento para esta interacción.

Es importante recalcar que hace falta realizar estudios *in situ*, en donde las cepas comerciales interactúen de manera directa con los factores bióticos y abióticos, además de realizar una mayor cantidad de repeticiones para mejorar la determinación.

Se propone analizar de manera específica los métodos de inoculación de estos microorganismos, además de analizar cómo se desarrollan estas interacciones en sistemas con diferentes tipos de manejo agrícola, para así determinar su impacto y viabilidad en cada uno de estos. A la par se podría realizar una comparación del impacto económico y productivo de la utilización de esta alternativa y de las prácticas convencionales de manejo.

Finalmente, es importante reconocer que hizo falta determinar la concentración de nutrientes en la parte radical y en diferentes estadios de desarrollo de la planta. Tampoco se realizó el análisis del porcentaje de colonización de *B. bassiana* y *T. harzianum* en la rizósfera de la planta, lo que pudo ocasionar limitaciones en la determinación de las interacciones.

## 9. REFERENCIAS

- 2000AGRO. (19 de Junio de 2014). 2000AGRO Revista Industrial del Campo. Recuperado el 15 de Octubre de 2015, de <http://www.2000agro.com.mx/agroindustria/retode-mexico-incrementar-en-10-por-ciento-la-tierra-cultivable/>.
- Akello, J., Dubois, T., Gold, C. S., Coyne, D., Nakavuma, J. & Paparu, P. (2007). *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(1), 34–42 pp. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.004>
- Alarcón AJJ, Almaraz S, Ferrera-Cerrato R, González-Chávez M, Lara M, Manares H, Quintero M, Santamaría R. (2004). Manual: Tecnología de hongos micorrízicos en la producción de especies forestales en vivero. Colegio de Posgraduados, Montecillo. SEMARNAT-PRONARE. 33-73 pp.
- Alexander, M. (1971). *Microbial Ecology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. 511pp.
- Arámbula, V. G., Méndez, A. A., González, H. J., Gutiérrez, A. E. y Moreno, M. E. (2004). Evaluación de una metodología para determinar características de textura de tortilla de maíz (*Zea mays* L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(2): 216-222.
- Aydinsakir, K., Erdal, S., Buyuktas, D., Bastug, R. y Toker, R. (2013). The influence of regular deficit irrigation applications on water use, yield, and quality components of two corn (*Zea mays* L.) genotypes. *Agricultural Water Management* 128: 65-71.
- Bailey & Scott. (2004). Diagnostico microbiológico. 11ª ed. *Medica Panamericana*. Madrid, España. pp. 688-691.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266

- Brady, N.C. y R.R. WEIL. (1996). Soils and chemical pollution. Chapter 18 of book *The Nature and Properties of Soils. Prentiss Hall Intnal.*
- Barocio-Hernández, C. (2014). “Estudio de las interacciones entre cepas comerciales de hongos promotores del crecimiento y antagonistas (*Trichoderma* spp.), y hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*).” Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Berlanga-Padilla, A. M. (2006). Reconocimiento de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.
- Bing LA, Lewis LC. (1992). Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Science and Technology* 2:39-47.
- 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.
- Boomsma C. R., Vyn T. J. (2008). Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Field Crops Research* (108):14-31.
- Borrero C. A., Silva M.R (2005). Efectos de *Trichoderma* (*in vitro*) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo oxysol clase IV del piedemonte llanero. Orinoquia. 9(2): 6-14.
- 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.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Alfaro-Cuevas, R. & López-Bucio, J. (2014). *Trichoderma* spp. Improve Growth of Arabidopsis Seedlings Under Salt Stress Through Enhanced Root Development, Osmolite Production, and Na(+) Elimination Through Root Exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 27(6), 503–14. <http://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0265-R>

- Cubillos-Hinojosa, J. & Valero, N. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var . *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 81–86.
- Dupuy L., Vignes M., McKenzie B.M. y White P.J. (2010). The dynamics of root meristem distribution in the soil. *Plant Cell Environ.* 33:358-369.
- Banco Mundial. (2013). Recuperado el 22 de Diciembre de 2015, de <http://datos.bancomundial.org/indicador/AG.CON.FERT.ZS/countries?display=graph>.
- FAOa (16 de Febrero de 2015). Recuperado el Diciembre de 2015, de <http://www.fao.org/news/story/es/item/277654/icode/>.
- FAO. (2015). Suelos y biodiversidad.
- FAO e IPGRI. (2001). El papel de la mujer en la conservación de los recursos genéticos del maíz. Guatemala.
- FAOSTAT. (2013). Recuperado el Diciembre de 2015, de <http://faostat3.fao.org/browse/R/RP/E>.
- Farr D.F., Rossman A.Y. (2006) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Consultado el 25 de junio 2015 en Retrieved June 25, 2015, en <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.
- Fassio, A., Carriquiry, A., Tojo, C. & Romero, R. (1998). *MAIZ: Aspectos sobre fenología*.
- Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. (1994). Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*.
- Ferron, P. (1981). Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. En Burges, H. D. Microbial control of pest and plant diseases 1970- 1980 p.
- Foty (2007). Todo sobre *Trichoderma*. Consultado en Foro electrónico Infojardín. <http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?t=39804>.

- Galeano, M., Mendez, F. & Urbajena, A. (2002). Efecto de *Trichoderma harzianum* rifai (cepa t-22) sobre cultivos hortícolas. *Koppert Biological Systems*, 1–11.
- Gashe, B.A.(1992). Cellulase production and activity by *Trichoderma sp.* A-001. *Journal of applied Bacteriology*, 73: 79-82.
- García De Salamone, I. E. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología*, 43, 1–3.
- García-Núñez, H. G. (2010). Aislamiento y caracterización molecular de especies nativas de *Trichoderma* de suelos hortícolas del valle de Toluca con potencial de biocontrol sobre *Sclerotinia spp.* Universidad Autónoma del Estado de México.
- Gavi, F. (2013). Uso de fertilizantes, 11. Retrieved from <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Uso de Fertilizantes.pdf>
- Gliessman, S. R. (2002). *Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible*. (E. Eric, Ed.) (Español). Costa Rica.
- Godes, A. (2007). Perspectivas de los inoculantes fúngicos en Argentina. pp. 11-14. En: Izaguirre-Mayoral, M.L., C. Labandera y J. Sanjuán (eds.). *Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial*. Imprenta Denad Internacional, Montevideo.
- González, M., I. Torres y H. Guzmán. (2002). Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. En: Proc. 16th Intl. Pepper Conf. 10 de noviembre de 2002. Tampico y Tamaulipas, México.
- Goran I., Ågren G.I., Franklin O. (2003). Root: Shoot Ratios, Optimization and Nitrogen Productivity. *Annals of Botany*. 92 795-800.
- Goodman M N, L W Brown (1988) Races of corn. In:G F Sprague, J W Dudley (eds). *Corn and Corn Improvement*. ASA Monograph 18 ASA, Madison, Wisconsin. pp:33-79.

- Goulding, K. (2000), Nitrate leaching from arable and horticultural land. *Soil Use and Management*, 16: 145-151.
- Gualandi R.J., Augé R.M., Kopsell D.A., Ownley B.H., Chen F., Toler H.D., Dee M.M. y Gwinn K.D. (2014). Fungal mutualists enhance growth and phytochemical content in *Echinacea purpurea*. *Symbiosis*. 63:111–121.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(1), 43–56. <http://doi.org/10.1038/nrmicro797>.
- Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A. & Chen, J. (2004). Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and *Maize* Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2), 147–153. <http://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.2.147>.
- Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E., Reeb V. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological research*. 111(5): 509-547.
- High-level panel of experts on the global Food crisis. (HLPE) 2012. Zero Hunger Challenge. (available at <http://www.un-foodsecurity.org/>).
- Hilda G. García-Núñez<sup>1</sup>, Sergio de J. Romero-Gómez<sup>2</sup>, Carlos. E. González-Esquivel<sup>3</sup>, E. Gabino Nava-Bernal<sup>1</sup>, A. R. M.-C. (2012). Isolation of native strains of *Trichoderma spp.* from horticultural soil of the valley of Toluca, for potential biocontrol of sclerotinia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15, 357–365.
- Hodge A. y Fitter A.H. (2010). Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107:13754–13759.

- Hoeksema J.D., Chaudhary V.B., Gehring C.A., Collins Johnson N., Karst J., Koide R.T., Pringle A., Zabinski C., Bever J.D., Moore J.C., Wilson G.W. T., Klironomos J.N. y Umbanhowar J. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecol Lett.* 13:394–407.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases :, 87(1).
- Humber R.A. (1997). Identification Fungi:153-186. En: Lacery L. (Ed). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press: 409.
- INEGI. (2010). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Recuperado el 14 de Agosto de 2015, de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=17484>.
- Infante, D., Martínez, B., González, N. & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14–21.
- Israelson, O.W. and West, F.L. (1992). "Water holding capacity of irrigated soils". Utah State Agricultural Experiment Station Bull 183: 1–24
- Johnson S.N. & Rasmann S. (2015). Root-feeding insects and their interactions rhizosphere. *Annu. Rev. Entomol.* 60:517–535.
- Karam-Quiñones, C. (2002). Los agroquímicos: una perspectiva jurídica-ambiental. Análisis del caso Sinaloa. Colegio de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 404 p.
- Klironomos N. J., Hart M. M. (2001). Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* (12):181-184.
- Kiers E.T., Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J.A., Franken O., Verbruggen E., Fellbaum C.R., Kowalchuk G.A., Hart M.M., Bago A., Palmer T.M., West S.A., Vandenkoornhuyse P., Jansa J. y Bücking H. (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science.* 303:880-882.

- Krauss, U., Hidalgo, E., Arroyo, C. & Piper, S. R. (2004). Interaction Between the Entomopathogens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the Mycoparasites *Clonostachys spp.*, *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. *Biocontrol Science and Technology*, 14(August 2014), 331–346. <http://doi.org/10.1080/09583150410001665196>.
- Lecuona R., B. Papierok y Riba.G. (1996). Hongos entomopatógenos: 35–60. En: Lecuona R. E. (Ed). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina.
- Lewis, L.C., Bruck, D.J., Gunnarson, R.D., Bidne, K.G., (2001). Assessment of plant pathogenicity of endophytic *Beauveria bassiana* in Bt transgenic and non-transgenic corn. *Crop Sci.* 41, 1395–1400.
- Li, H., Xiang, D., Wang, C., Li, X. & Lou, Y. (2012). Effects of epigeic earthworm (*Eisenia fetida*) and arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) on enzyme activities of a sterilized soil-sand mixture and nutrient uptake by maize. *Biology and Fertility of Soils*, 48(8), 879–887. <http://doi.org/10.1007/s00374-012-0679-0>.
- López-Carmona, D. A. (2013). Respuesta de micorrizas de maíz (*Zea mays*) a un gradiente de estrés hídrico y fertilización mineral. Tesis de Maestría, UNAM.
- López-Geta, J.A., C. Martínez-Navarrete, L. Moreno-Merino, P. Navarrete-Martínez. (1992). Las aguas subterráneas y los plaguicidas. Instituto Geológico y minero de España. 149 p.
- Llorca L. R. (2006). Prácticas de atmósfera, suelo y agua. Editorial Universidad Politécnica de Valencia 107 p.
- Mar-Vázquez, M., César, S., Azcón, R. & Barea, J. M. (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology*,

15(3), 261–272. [http://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00075-5](http://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00075-5)

- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H. & Cruz, A. (2008). SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp. CANDIDATOS A BIOFUNGICIDAS PARA EL CONTROL DE *Rhizoctonia* sp. EN ARROZ, 23(2), 118–125.
- Martínez-Medina, A., Pascual, J. A., Pérez-Alfocea, F., Albacete, A. & Roldán, A. (2010). *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. *Phytopathology*, 100, 682–688. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-100-7-0682>
- Martínez-Medina, A., Roldán, A., Albacete, A. & Pascual, J. A. (2011). The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. *Phytochemistry*, 72, 223–229. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.008>.
- 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.
- McLaughlin, D. J., Hibbett, D. S., Lutzoni, F., Spatafora, J. W. & Vilgalys, R. (2009). The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology*.
- 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.
- Murphy, J. y Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27:31–36
- Norse, D. (2003). Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization. *IFA-FAO agriculture conference*. Roma.

- Novasem, (2013). [www.novasem.com.mx](http://www.novasem.com.mx). Consultado el día 14 de Octubre de 2013
- Osuna, A. E. 1995. El cuerpo de los insectos: la pared del cuerpo. En: Osuna, A. E. (Ed.). *Morfología del exoesqueleto de los insectos*. Universidad central de Venezuela pp. 73-76
- Novara, L. J. & Neumann, R. A. (2012). P O A C E A E Barnhart (= Gramineae Juss.). *Aportes Botánicos de Salta*, 11, 1–6.
- OCDE. (2011). Análisis del Extensionismo Agrícola en México. *OCDE Mejores Políticas Para Una Vida Mejor*, 73.
- Okoth, S. a., Otadoh, J. a. & Ochanda, J. O. (2011). Improved seedling emergence and growth of maize and beans by *Trichoderma harziunum*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(1), 65–71.
- Omann, M. R., Lehner, S., Escobar Rodríguez, C., Brunner, K. & Zeilinger, S. (2012). The seven-transmembrane receptor Gpr1 governs processes relevant for the antagonistic interaction of *Trichoderma atroviride* with its host. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 1), 107–18. <http://doi.org/10.1099/mic.0.052035-0>
- Otadoh, J. A., Okoth, S. A., Ochanda, J. & Kahindi, J. . (2011). Assessment of *Trichoderma* Isolates for Virulence Ef FOR VIRULENCE EFFICACY. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(2011), 99–107.
- Ownley B.H., Griffin M.R., Klingeman W.E., Gwinn K.D., Moulton J.K. y Pereir R.M. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *J Invertebr Pathol*. 98:267–270.
- Paliwal RL., Granados G. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y Producción. Citado el 14 de Septiembre del 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s00.htm#toc>.
- Petlamul, W. & Prasertsan, P. (2012). Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity.

*Mycobiology*, 40(2), 111–116. <http://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.2.111>

Pham T A, Kim J J, Kim S G, Kim K. (2009). Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. *Mycobiol.* 37(3): 218-224.

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.

Pretty, J., Brett, C, Gee, D, Hine, R., Mason, C., Morison, J., Raven, H., Rayment G., van der Bijl G. and T. Dobbs (2001), “Policy Challenges and Priorities for Internalising the Externalities of Modern Agriculture”, *Journal of Environmental Planning and Management*, 44 (2): 263-283.

*Producción Mundial Maíz*. (21 de Diciembre de 2015). Recuperado el 22 de Diciembre de 2015, de <https://www.produccionmundialmaiz.com/>.

Raya-Hernández, A. I. (2015). Efectos de los promotores de crecimiento vegetal *Glomus* intraradices y *Azospirillum brasilense* contra el patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de Chile. Tesis de licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

Rendón, C., Rueda, M., Carlos, G., Campuzano, E., En, E., Uso, E. L., Valles, D. E. M. D. E. (2012). Eficiencia en el uso de la radiación por híbridos de maíz de Valles Altos de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(0187-7380).

Requena N., Serrano E., Ocón A., Breuninger A. (2007). Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* (68):33-40.

Reyes C P (1990). *El maíz y su cultivo*. AGT Editor S.A. México. 460p.

Ritchie S W, J J Hanway (1982) How a corn plant crop develops. Special Report 48. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service, Ames, IA.

- Romero, A. (2013). Falta sembrarcultura de nutrición vegetal. *Agrointeligente*, 1-15.
- Ronald M.A. (2002). Introducción a la ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Addison-Wesley. 4a edición. España. Págs. 677.
- Rosas Garcia, N. M. (1999). *Desarrollo de formulados asperjables de Beauveria Bassiana (Balsamo vuillemin) Utilizando diversos polimeros*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ryder, L. S., Harris, B. D., Soanes, D. M., Kershaw, M. J., Talbot, N. J. & Thornton, C. R. (2012). Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 1), 84–97. <http://doi.org/10.1099/mic.0.051854-0>
- Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Rasoulían GR, Bandani AR, Butt TM. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270 (1): 116-123.
- Sánchez J, Goodman M. (1992). Relationships among the mexican races of maize. *Economical Botany* 46, 72-85.
- Salazar, A. H. C. y Godínez, G. M. M. (2010). El maíz y sus usos estrategicos. En: De León, C. y Rodríguez, M. R. (Eds.). *El cultivo del maíz - Temas selectos II*. Colegio de Postgraduados pp. 35-48.
- Sarabia-Ochoa, M. E. (2012). El papel de los hongos micorrízicos arbusculares y microorganismos asociados en la salud de las raíces del maíz. Tesis para la obtener el grado en maestro en ciencias biologicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Scherm, B., Schmoll, M., Balmas, V., P.Kubicek, C. & Migheli, Q. (2008). Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Springerlink.com*, 81–91. <http://doi.org/10.1007/s00294-008-0226-6>

Schüßler A, Walker C (2010) The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Arthur Schüßler & Christopher Walker, Gloucester. Published in December 2010 in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. Electronic version freely available online at [www.amf-phylogeny.com](http://www.amf-phylogeny.com)

SIAP-SAGARPA. (2014). Panorama del Maíz. Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal Y Pesquero.

Smith S. E., Read D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press in Elsevier. Great Britain. 785 p.

Smith S.E. & Smith F.A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:227–50

Sung G-H, Hywel-Jones NL, Sung J-M, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* (57) :5–59, doi:10.3114/sim.2007.57.01.

Sosa, T., Sanchez, J., Morales, E. & Cruz, F. (2006). Interacción micorrizas arbusculares-*Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* (Poaceae); Arbuscular. *Acta Biol. Colomb*, 11(1), 43–54. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=469089&indexSearch=ID>.

Thomas, C.D., Cameron, A., Green, R.E., Bakkenes, M., Beaumont, I.J., Collingham, Y.C. & Hannah, I. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, 427(6970), 145–148.

Tovar-Castaño, J. C. (2008). Evaluación de la capacidad antagonista “in vivo” de aislamientos de *Trichoderma spp.* frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

- Uhart, S. a, Uarth, S. & Echeverría, H. (2002). El rol del nitrógeno y del fósforo en la producción de maíz, 47. Retrieved from [http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh\\_0032/0901b8038003272b.pdf?filepath=ar/pdfs/noreg/013-53003.pdf&fromPage=GetDoc](http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_0032/0901b8038003272b.pdf?filepath=ar/pdfs/noreg/013-53003.pdf&fromPage=GetDoc)
- Vinale, F., Flematti, G., Sivasithamparam, K., Lorito, M., Marra, R., Skelton, B. W. & Ghisalberti, E. L. (2009). Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 72(11), 2032–2035. <http://doi.org/10.1021/np900548p>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., ... Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(1-3), 80–86. <http://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Windham, M. T., Y, E. & Baker, R. (1986). A Mechanism for increased plant Growth Induced by *Trichoderma* spp.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553–596. <http://doi.org/10.1080/09583150701309006>.
- Zitlalpopocan Hernández, G (2015). Interacciones multitróficas entre larvas rizófagas (*Phyllophaga vetula*), hongos entomopatógenos (*Beauveria Bassiana*) y hongos micorrízicos arbusculares. *John Larsen*. Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from <http://python-compiler-unam2011-2.googlecode.com/svn-history/r4/trunk/proyecto1/Readme.pdf>.

## 10. 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. CRUCO - U.A. de México
		Tipo de Análisis :	Suelo
		Agricultura :	Riego
		Cultivo :	Maíz

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL SUELO		REACCIÓN DEL SUELO	
Área :	19.48%	Árcilla :	53.34%
		Limo :	27.26%
Tipo de Suelo :	Árcilla	pH (1:2 agua) :	7.28 Neutro
Punto de Saturación :	50.0 % Mod. Alto	pH (1:2 CaCl <sub>2</sub> ) :	ND ND
Capacidad de Campo :	37.5 %	Carbonatos Totales (%) :	1.46 Bajo
Punto March. Perm. :	19.7 %	Requisarizantes de Cal :	No Req. Ton/Ha
Cond. Hidráulica :	ND cm/hr ND	Requisarizantes de Yeso :	No Req. Ton/Ha
Densidad Aparente :	1.17 g/cm <sup>3</sup>	Color Munsell :	

FERTILIDAD												
Muy Alto												
Alto												
Mod. Alto												
Mediano												
Mod. Bajo												
Bajo												
Muy Bajo												
Determinación	MO	N-Inorg	P-Easy	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	2985	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			
CEs : 0.47 dS/m	RAS : 4.47			Muy Alto			
pHs : 7.10	PSI : 3.72			Alto			
				Mod. Alto			
				Medio			
				Mod. Bajo			
				Bajo			
				Muy Bajo			
				Grado de	Salas	RAS	PSI
Cationes (meq/l)	Aniones (meq/l)			Relacion	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K
Ca <sup>++</sup> : 0.40	CO <sub>3</sub> : 0.40			Resultados	2.56	7.55	26.9
Mg <sup>++</sup> : 0.30	HCO <sub>3</sub> : 0.60			Rango Medio	2 - 6	2 - 3	20 - 30
Na <sup>+</sup> : 0.95	Cl <sup>-</sup> : 1.11						
K <sup>+</sup> : 0.71	SO <sub>4</sub> : 2.43						
PO <sub>4</sub> : 0	N-NO <sub>3</sub> : 0						

PORCENTAJE ACTUAL Y SUGERIDO DE LAS BASES DE CAMBIO									
		H	Al	Acidos Total Interc.	Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	CIC
Resultado	meq/100 gr	ND	ND	ND	14.9	5.81	0.77	0.83	22.3
	% Actual	ND	ND	ND	66.8	26.1	3.45	3.72	
Sugerido	% Sugerido	0 - 5	0 - 5	0 - 10	65 - 75	10 - 20	ND	0 - 5	

COMENTARIOS	ATENTAMENTE
	<b>IBQ MAYRA LIZBETH FRIAS P.</b> 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