



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LICENCIATURA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Escuela Nacional de Estudios Superiores,
Unidad Morelia

“Efecto de los hongos micorrízicos
arbusculares nativos de la Ciénega de
Zacapu en el desarrollo de maíz”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

Dania Fabiola Alcántar Luna

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. Dante A. López Carmona y Dr. John Larsen

MORELIA, MICHOACÁN

Junio, 2018



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

“Efecto de los hongos micorrízicos
arbusculares nativos de la Ciénega de
Zacapu en el desarrollo de maíz”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A

Dania Fabiola Alcántar Luna

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. Dante A. López Carmona y Dr. John Larsen

MORELIA, MICHOACÁN

Junio, 2018

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1. LA IMPORTANCIA DEL MAÍZ	10
2.2. NUTRICIÓN VEGETAL	11
2.2.1. Disponibilidad de nutrientes por las plantas	11
2.2.2. Importancia del fósforo en la nutrición vegetal	12
2.2.3. Nutrición del maíz.....	13
2.3. RIZÓSFERA Y MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL	13
2.3.1. Rizósfera.....	13
2.3.2. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal.....	14
2.4. HONGOS MICORRÍZICOS	15
2.4.1. Generalidades de los hongos micorrízicos arbusculares.....	15
2.4.2. Relación de simbiosis micorrízica y disponibilidad de P en el suelo	16
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
General.	17
Específicos.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1. PRIMERA FASE EXPERIMENTAL	18
6.1.1. Diseño experimental.....	18
6.1.2. Materiales biológicos	19
6.1.3. Preparación del sustrato y fórmula de fertilización.....	19

6.1.4.	Condiciones experimentales	20
6.1.5.	Variables medidas	21
6.1.6.	Estimación del porcentaje de colonización micorrízica	22
6.1.7.	Análisis estadísticos	23
6.2.	SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL	24
6.2.1.	Diseño experimental.....	24
6.2.2.	Materiales biológicos	24
6.2.3.	Preparación del sustrato y fórmula de fertilización.....	25
6.2.4.	Condiciones experimentales	25
6.2.5.	Variables medidas	25
6.2.6.	Estimación de N y P en la parte aérea del maíz	26
6.2.7.	Análisis estadísticos	27
7.	RESULTADOS	28
8.	DISCUSIÓN	43
9.	CONCLUSIONES	47
	BIBLIOGRAFÍA	49

Agradecimientos

Agradezco a la UNAM, mi querida casa de estudios, y a la Licenciatura en Ciencias Ambientales por todas las experiencias, las herramientas y los aprendizajes que me brindaron durante mi formación académica.

Agradezco a todos aquellos que, de alguna u otra forma, me apoyaron durante toda mi carrera. Sobre todo a aquellos que estuvieron conmigo durante la construcción y elaboración de este proyecto. En especial a mis tutores, Dante A. López y a John Larsen por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su apoyo y por dejarme recorrer este último capítulo de la licenciatura en su compañía, además por compartir conmigo su conocimiento y pasión por el maíz y las micorrizas.

A los sinodales y profesores de la licenciatura: Dra. Marta Astier Calderón, Dr. Pablo Jaramillo López, Dra. Ana Isabel Moreno Calles y Dr. Roberto Lindig Cisneros por sus sugerencias y aportaciones a este trabajo.

A mis profesores de la carrera, que dedicaron tiempo para compartir sus conocimientos, por impulsarme a seguir adelante y motivarme a lograr mis metas. Por ellos y su esfuerzo logré ver todas las realidades que construyen mi país, y así poder aplicar mi conocimiento.

A los administrativos y secretarios que cada semestre me ayudaron a resolver los problemas de registro e inscripciones; y me ayudaron en los trámites de titulación.

A la M en C. Maribel Nava Mendoza por apoyarme con los análisis de fósforo y por permitirme utilizar las instalaciones del LANIES (Laboratorio Nacional de Innovación Ecotecnológica para la Sustentabilidad) para mis análisis.

Agradecimientos personales

A todos mis amigos de la ENES: Ximena, Gloria, Fernanda R., Paola, Polo, Christopher, “Monti”, Pablo, Lizbeth, Luisa, Erandi, “Lulú”, Armando, Lupita, “Connie” y Dalia, porque el conocerlos y compartir con ustedes nuestras preocupaciones y lo que más nos apasiona, es la más increíble experiencia de haber venido a Morelia. Les agradezco su apoyo desde el inicio y durante la carrera, así como el tiempo y los innumerables momentos que hemos compartido, y la oportunidad de formar con ustedes una familia.

A mis compañeros de área de profundización (Manejo de Socio-ecosistemas) por hacer increíbles, divertidas e inolvidables tantas horas en el salón de clases.

A mis compañeros del laboratorio: Andrea, Semiramis, Yadira, Estefanía, Karla, Omar, Carlos, Miguel, Dante y John que me apoyaron en mis cosechas, análisis y desarrollo de mi proyecto. Además de brindarme su amistad y sus conocimientos dentro y fuera del laboratorio.

A Adriana Flores y Alexander Quevedo por el apoyo emocional durante la realización de mi tesis.

A mis padres, Jaime y Alejandra por alentarme a seguir adelante con mi vida académica, a pesar de lo que implicaba para ellos y el dejar mi hogar para formarme como Licenciada.

A mi hermana Mariana† y mi prima Karen† que me apoyaron al decidir esta licenciatura y que por ellas he logrado culminar.

A mis abuelitos: “Conchita”†, Juana† y Ramón† que me vieron iniciar la carrera y me brindaron consejos para llegar a la meta.

A mis tías, tíos y primos que me apoyaron para seguir adelante, en especial a mi prima Laura por estar conmigo en la vida de estudiante lejos de mis padres.

Y finalmente a mis amigos: Diana, Karen, David, Eloisa, Liliana y Saraí que me motivaban para realizar uno de mis más grandes sueños y llegar a la meta superando todos los obstáculos que se presentaran.

Dedicatoria

A toda mi familia

A mi familia moreliana

A mis amigos y compañeros

Especialmente a mis padres, a Mariana† y a Karent†

1. INTRODUCCIÓN

El maíz es un cereal de suma importancia a nivel mundial para consumo humano, animal y en la producción de energía. Es un cultivo que requiere de insumos agrícolas ricos en fósforo para su producción, así como para mejorar el desarrollo. México es el centro de origen y diversificación de maíz. Actualmente se reconocen 56 razas nativas de maíz que han sido la base para el desarrollo de variedades mejoradas de maíz (Sánchez et al., 2014). Además se produce en sistemas tradicionales con bajos insumos agrícolas y en sistemas convencionales con uso de tecnología moderna (Baldovinos, 2002).

En la agricultura convencional se utilizan grandes cantidades de agroquímicos, como los fertilizantes nitrogenados y fosforados. Sin embargo el uso excesivo de estos agroquímicos en la producción agrícola tiene impactos ambientales como la contaminación de suelos, cuerpos de agua superficiales y subterráneos, pérdida de biodiversidad de insectos, plantas y microorganismos (Larsen et al. 2015).

El uso de fertilizantes puede modificar las características químicas del suelo, cómo cambios en el pH, la conductividad eléctrica y cambios en la composición de las comunidades de microorganismos del suelo y por ende alterar procesos ecológicos del suelo como la disponibilidad de nutrientes (Larsen et al. 2014)

El impacto ambiental de los agroquímicos en los sistemas de producción agrícola, ha motivado el desarrollo de investigación científica interdisciplinaria para generar alternativas que reduzcan el impacto de la producción, el rendimiento y la sustentabilidad de los agroecosistemas (Gliessman et al. 2007).

Se ha encontrado que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos simbiotes que naturalmente pueden facilitar la adquisición de nutrientes de las plantas, principalmente fósforo (Smith & Read 2008). Una alternativa para incrementar la sustentabilidad de los sistemas agrícolas es el aprovechamiento de la simbiosis de los HMA con el fin de reducir el uso de fertilizantes de síntesis química (Gianinazzi et al., 2010).

Pájaro (en comunicación directa) clasificó el suelo de la Ciénega de Zacapu como un sustrato orgánico debido a la gran cantidad de materia orgánica que contiene, pero con baja disponibilidad de fósforo. Además, en la Ciénega de Zacapu

predomina el cultivo de maíz convencional con uso de variedades híbridas y fertilizantes fosforados. Por lo tanto, el presente trabajo se enfoca en evaluar a los HMA nativos de la Ciénega de Zacapu en la mejora del desarrollo de las plantas de diferentes genotipos de maíz cuando el fósforo mineral es limitado.

2. ANTECEDENTES

2.1. La importancia del maíz

El maíz tiene su centro de origen en Mesoamérica y la hipótesis más aceptada es que es el resultado de un proceso de selección y mejoramiento que el hombre ha realizado a partir de su ancestro, el teocintle. Ambos se desarrollaron de una manera simbiótica, de tal forma que el maíz ha perdido su capacidad de dispersión. El maíz regularmente se cultiva en un ciclo anual de siembra que se lleva a cabo desde hace más de 5,000 años (Espinoza, 2011).

El maíz es el cultivo agrícola más representativo e importante para México, debido a su importancia nutricional, económica y cultural. La producción de maíz se puede llevar a cabo en sistemas de producción contrastantes dependiendo de las condiciones del ambiente y tecnología disponible. En México, los diferentes sistemas de producción, así como las condiciones orográficas han fomentado el desarrollo una amplia diversidad de razas nativas y variedades comerciales de maíz (Rocandio-Rodríguez et al., 2014).

El maíz es una planta del género *Zea* y en México existen 54 razas de maíz (Sánchez et al., 2014). El maíz es una planta monocotiledónea, de hábito anual y de porte robusto. Tiene el tallo simple, puede alcanzar más de 2.5 metros. Cuenta con pocas ramificaciones, nudos, entrenudos y médula esponjosa. También con panojas, que son las encargadas de desarrollar los granos. El número de hileras de las mazorcas siempre es par y varía entre 12 y 24. Son plantas monoicas con inflorescencias unisexuales (Rzedowski y Calderón, 2001).

El desarrollo de maíces híbridos más productivos que los nativos se ha incrementado por a la demanda de grano para la alimentación humana y para la ganadería alrededor del mundo. A partir de la Revolución Verde se ha fomentado

el uso y desarrollo de variedades mejoradas de maíz, las cuales se han desarrollado a partir del pool genético de las razas de maíz nativas. Aspectos sociales como la economía y la cultura de los productores de maíz han guiado el uso y conservación de los genotipos de maíz híbridos y nativos en México (Lazos-Chavero, 2014).

Los maíces nativos son las razas que contienen su germoplasma conservado, además está adaptado a las condiciones locales o regionales. En su mayoría, las razas de maíz han sido desarrolladas y conservadas por grupos étnicos que han practicado la agricultura como medio de subsistencia por múltiples generaciones. La selección de maíz ha sido influenciada por elementos culturales y económicos como: el rendimiento, tamaño de mazorca, color, sabor, palatabilidad, resistencia a plagas y enfermedades, etc. (Reyes y Cantú, 2006). Así mismo, podemos decir que los maíces nativos contienen niveles de variación importantes en atributos morfológicos, agronómicos y utilitarios (Muñoz, 2005).

Los maíces híbridos son el resultado del mejoramiento genético a partir de la cruce de razas nativas con el fin de conferir las características más sobresalientes de sus progenitores. Los maíces híbridos generalmente tienen atributos de alto rendimiento, resistencia a plagas, enfermedades y estrés ambiental como sequía (Espinosa et al., 2008).

2.2. NUTRICIÓN DE LA VEGETAL

2.2.1. Disponibilidad de nutrientes en el suelo

La disponibilidad de nutrientes para las plantas depende de procesos conocidos como ciclos biogeoquímicos, los cuales se llevan a cabo de manera natural en el suelo; un ejemplo de ello es la mineralización de la materia orgánica. De forma natural, la disponibilidad de los nutrientes esenciales es regulada por los microorganismos del suelo (Murphy et al., 2007).

El nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K) son macronutrientes o nutrientes fundamentales para el desarrollo de las plantas. Además existen otros elementos como el hierro, magnesio, cobre y boro, que son requeridos en menor cantidad. A dichos elementos se les denomina micronutrientes (Drinkwater & Snapp, 2007). El

desarrollo de las plantas de maíz está regulado por la disponibilidad de nutrientes en el suelo. La ley del mínimo de Liebig menciona que el máximo desarrollo de una planta está limitado por la disponibilidad del nutriente más limitante (Garate & Bonilla, 2008).

El pH es una característica importante para la estructura del suelo que limita la disponibilidad de los nutrientes. El fósforo es absorbido por las plantas en forma de ortofosfato (PO_4), sin embargo, es un nutriente altamente reactivo con otros compuestos del suelo y arcillas, por lo que su disponibilidad suele ser baja (Barančíková et al., 2007). Por su parte el nitrógeno para las plantas se absorbe básicamente en forma de amonio (NH_4^+) y de nitrato (NO_3^-) (Hayatsu et al., 2008).

2.2.2. Importancia del fósforo en la nutrición vegetal

El fósforo es un macro nutriente que regula el desarrollo de las plantas, como: el crecimiento de las raíces, la maduración del fruto y aumenta la resistencia a las condiciones ambientales (Schachtman et al. 1998). La cantidad de fósforo en el suelo puede variar entre 100 y 3000 mg de P/kg de suelo, sin embargo, las plantas absorben fósforo del suelo en forma de ortofosfatos en la mayoría de suelos el fósforo se encuentra en formas no asimilables o de difícil absorción para las plantas. El fósforo se puede encontrar en el suelo como materia orgánica, oculto en arcillas, en formas químicas no asimilables, como parte de las rocas, en la microbiota del suelo y solo una pequeña fracción puede estar como ortofosfatos disponibles (Walker y Syers, 1976).

La disponibilidad de fósforo está altamente influenciada por la actividad de los microorganismos solubilizadores de fósforo, así como por los procesos microbianos de mineralización de la materia orgánica del suelo. Sin embargo los procesos microbianos son regulados por factores como: el tipo de suelo, la cobertura vegetal, la composición y función de microorganismos y las condiciones del ambiente y del propio suelo como el pH. Las fuentes y la distribución del P en el suelo son de suma importancia para la agricultura, ya que favorece el desarrollo y productividad de las plantas (Richardson et al., 2009)

2.2.3. Nutrición del maíz

El nitrógeno puede constituir entre el 1.5 y el 3% del peso seco de las plantas de maíz y un indicador biológico de la deficiencia de nitrógeno en las plantas de maíz es la coloración amarilla en las hojas incluyendo las nervaduras (Westgate et al., 2000). Por su parte, el fósforo puede contener entre el 0.1 y el 0.5% de la biomasa seca del maíz y típicamente se puede observar una coloración púrpura en las hojas de maíz cuando las plantas presentan limitación de fósforo para el desarrollo (Calderón-Vázquez et al. 2009).

El maíz puede desarrollar cuatro mecanismos para reducir la limitación de fósforo en el crecimiento: 1) liberación de P a partir de fuentes orgánicas e inorgánicas a través de síntesis de exudados, 2) modificación de la arquitectura radicular para explorar un mayor volumen de suelo, 3) reciclaje y movilización de P del tejido vegetal, 4) y por último el establecimiento de simbiosis con los HMA (Calderón-Vázquez et al., 2009).

2.3. RIZÓSFERA Y MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

2.3.1. Rizósfera

Se le conoce como rizósfera a la interacción entre el suelo, la microbiota y las raíces de las plantas y componentes provenientes de las ellas (Lynch y de Leij, 2002) (Figura 1). La rizósfera tiene gran importancia dentro de ciclos biogeoquímicos que permiten la disponibilidad de los nutrientes para las plantas (Azcón-Aguilar y Barea, 1992).

Existen factores que determinan la extensión de la rizósfera en el suelo como: la temperatura del suelo, el pH de suelo, la disponibilidad de oxígeno, la disponibilidad de agua y la estructura del suelo (Lynch y de Leij, 2002).

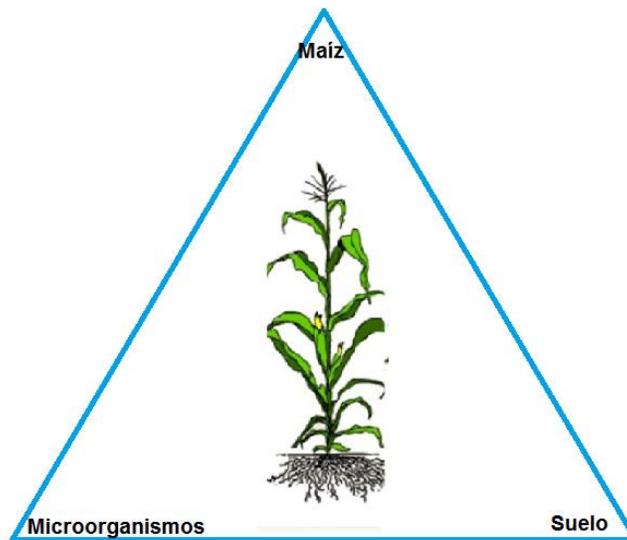


Figura 1. Relación maíz-suelo-microorganismo

2.3.2. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) son grupos de bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y algas, que estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Madhaiyan et al., 2009). Los MPCV, tiene la capacidad de fijar nitrógeno, sintetizar fitohormonas, solubilizar nutrientes del suelo, mineralizar la materia orgánica, pueden fungir como sideróforos (Vessey, 2003).

Los MPCV tienen la capacidad de colonizar la rizósfera y modificar la composición física y química del suelo, mediante cambios en el pH y, el potencial hídrico mediante la síntesis de enzimas. Los MPCV también pueden proteger a las plantas contra patógenos y diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Uno de los principales grupos de microorganismos promotores del crecimiento vegetal son los hongos micorrízicos (Vessey, 2003).

2.4. HONGOS MICORRÍZICOS

Los hongos micorrízicos es un grupo genérico de hongos que establecen simbiosis mutualista con las raíces de las plantas. Dentro de esta simbiosis, los hongos se benefician de los carbohidratos derivados de la fotosíntesis y a su vez, las plantas obtienen nutrientes y protección contra diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Smith y Read, 2008). Los hongos micorrízicos pueden clasificarse en seis tipos de asociación según las estructuras que forman dentro de las raíces: Arbuscular, Ectomicorriza, Orquideoide, Arbutoide, Ectendomicorriza, Monotropoide y Ericoide

El establecimiento de la simbiosis micorrízica puede alterar las funciones de sus hospederos como: cambios en la morfología de las raíces, regulación de los procesos de fotosíntesis bajo condiciones de estrés, la acumulación de carbohidratos en el sistema radicular, etc. (Azcón-Aguilar y Barea, 1992).

2.4.1. Generalidades de los HMA

Los HMA establecen una de las simbiosis más desarrolladas en la naturaleza (Montaño et al., 2012). Para Johnson (2013) las características fenológicas, fisiológicas y morfológicas que determinan la simbiosis micorrízica tiene un efecto a diversas escalas; es decir, que afectan desde lo individual (planta-hongo) hasta una escala global (Johnson et al., 2006)

Los HMA se ubican en el phylum Glomeromycota con tres clases, cinco órdenes, 14 familias y 29 géneros (Oehl et al., 2011). La distribución de los HMA es cosmopolita, de tal modo que es posible encontrarlos tanto en sistemas agrícolas así como en la mayoría de los ecosistemas de casi todo el mundo (Ramos-Zapata et al., 2004).

Los HMA tienen un papel importante en la estructura del suelo y el desarrollo de las plantas silvestres y cultivadas (Alarcón, 2007). Es por ello que su presencia es fundamental en la sostenibilidad de los sistemas agrícolas (Gianinazzi et al., 2010).

2.4.2. Relación de simbiosis micorrízica y disponibilidad de P en el suelo

En la simbiosis micorrízica, las plantas facilitan a los hongos carbohidratos derivados de la fotosíntesis y a su vez los HMA transportan principalmente fósforo de la solución del suelo a las raíces de las plantas. La limitación de nutrientes es un factor común en ecosistemas conservados como en condiciones agrícolas. La limitación de fósforo en el suelo, promueve el establecimiento de la simbiosis para facilitar la adquisición del fósforo (Smith y Read, 2008).

Treseder y Allen (2002) proponen que existe una relación directa entre fertilidad y la biomasa micorrízica. En donde, a menor disponibilidad de N o P también hay limitación de crecimiento de HMA. Dicha limitación para ambos simbiontes es reducida con forme se reduce la limitación de nutrientes. En condiciones de alta disponibilidad de N y P, las plantas reducen la asignación de carbohidratos para los HMA, por lo que la biomasa de los hongos se reduce mientras que la biomasa de las plantas continúa acumulándose (Figura 2).

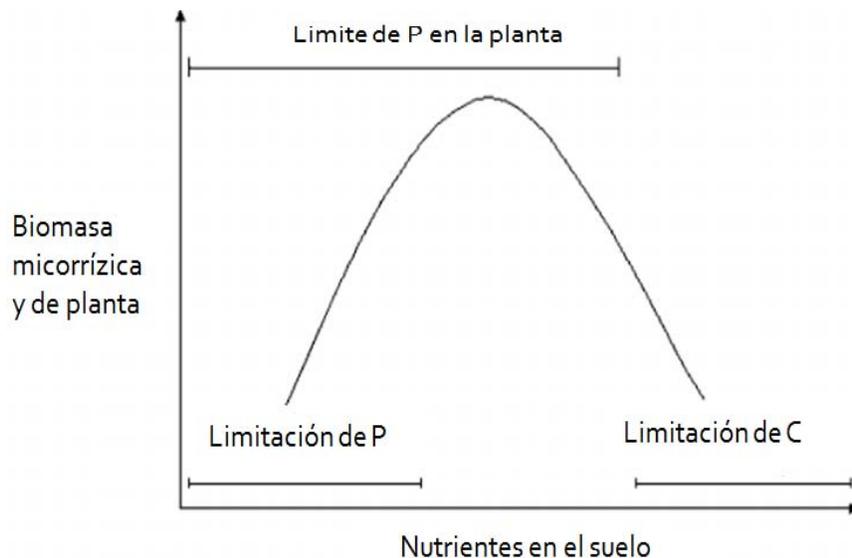


Figura 2. Gráfica de la relación entre la fertilidad (disponibilidad de nutrientes) y la biomasa micorrízica de Treseder & Allen (2002).

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de los HMA nativos de la Ciénega de Zacapu en el desarrollo de diferentes genotipos de maíz?

4. HIPÓTESIS

Los HMA nativos del suelo de la Ciénega de Zacapu pueden reducir la deficiencia de fósforo para el desarrollo vegetal, pero su contribución depende del genotipo de maíz y de la fertilización mineral.

5. OBJETIVOS

General

Analizar el efecto de los HMA nativos de la Ciénega de Zacapu en el desarrollo de maíz

Específicos

Analizar el efecto en el crecimiento de diferentes genotipos de maíz en presencia y ausencia de HMA nativos de la Ciénega de Zacapu bajo un gradiente de fertilización fosfatada.

Evaluar el aporte de los HMA nativos de la Ciénega de Zacapu en el desarrollo de una variedad de maíz susceptible a deficiencia de fósforo

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Agroecología del Instituto de Investigaciones Ecológicas y Sustentabilidad (IIES) de la UNAM- Campus Morelia. Para esta investigación, se realizaron dos fases experimentales. En la primera fase experimental se analizó la contribución de los HMA nativos en diferentes genotipos de maíz en un gradiente de fertilización fosfatada. La segunda fase se realizó para profundizar en el aporte de los HMA nativos de una variedad de maíz que es susceptible a la deficiencia de fósforo en un suelo con baja disponibilidad de dicho nutriente.

6.1. PRIMERA FASE EXPERIMENTAL

La primera fase experimental tuvo como objetivo el analizar el efecto en el crecimiento de diferentes genotipos de maíz en presencia y ausencia de HMA nativos bajo un gradiente de fertilización fosfatada.

6.1.1. Diseño experimental

Se diseñó un experimento multifactorial con un total de 30 tratamientos y 120 unidades experimentales (Cuadro 1 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Cuadro 1. Diseño experimental de la primera fase

FACTOR	NIVEL	TOTAL
Genotipo de maíz	-Chalqueño (nativo)	3
	-Chalqueño braquítico (híbrido)	
	-Línea mejorada (híbrido)	
HMA	-Sin HMA	2
	-Con HMA	
Fertilización	-Sin fertilización	5
	-0 mg de P con micro y macronutrientes	
	-50 mg de P con micro y macronutrientes	
	-200 mg de P con micro y macronutrientes	
	-500 mg de P con micro y macronutrientes	
TRATAMIENTOS		30

6.1.2. Materiales biológicos

Se utilizó una raza de maíz nativo (Chalqueño) y dos híbridos (Chalqueño braquítico y una Línea mejorada). Las semillas fueron donadas por el Dr. José Alfredo Carrera Valtierra del Centro Regional Universitario Oriente de la Universidad Autónoma de Chapingo. Dichas semillas fueron cosechadas en la misma parcela agrícola de donde se colectó el suelo (Cantabria, Zacapu).

El Chalqueño es una de las razas de maíz más productiva, se caracteriza por tener un porte alto, mazorcas grandes y con 12 hileras de granos. Así mismo, tiene un alto valor de germinación. Es una raza de ciclo largo y resistente a sequía (Herrera-Cabrera *et al.*, 2000). El Chalqueño braquítico y la línea mejorada, tiene como base genética de fitomejoramiento la raza nativa Chalqueño.

Para la obtención de los tratamientos control (sin HMA nativos) se aplicó el fungicida Benomilo (Metil-1(butilcarbamoil) benzimidazol-2-ilcarbamato) al 50% de ingrediente activo) de la marca ADAMA en una dosis de 1 g/kg de sustrato. Se realizaron dos aplicaciones de fungicida, la primera al inicio del experimento y la segunda aplicación en la cuarta semana de crecimiento.

6.1.3. Preparación del sustrato y fórmula de fertilización

Se colocaron macetas con 1100 gramos de sustrato, el cual fue una mezcla de suelo agrícola de la localidad de Cantabria, Municipio de Zacapu, Michoacán (19° 50' 22.64"N; 101°45' 31.63" O). El suelo fue analizado en el Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal del INIFAP, se determinó que el suelo es ácido con un pH de 5.86 con 71.85% de materia orgánica, 64.55 ppm de nitrógeno, 15.25 ppm de fósforo. Además un suelo franco con 45.48%, 11.28%, 43.24% de arena, acilla, limo respectivamente. Además, se identificaron altas concentraciones de Ca (4,589.85 ppm) y Fe (268.26 ppm). El suelo fue mezclado con arena de mina del Municipio de Zinapécuaro, en una proporción 1:1 (v/v).

Todos los nutrientes fueron aplicados durante el establecimiento del experimento. A partir la quinta semana de crecimiento se aplicó 30 mg extra de NH₄NO₃ hasta

la semana 9. La fórmula de fertilización que se aplicó a los tratamientos con micro y macro nutrientes fue la desarrollada por el Laboratorio Nacional Riso de Dinamarca (Cuadro 2).

Cuadro 2. Soluciones nutritivas aplicadas en los tratamientos con fertilización mineral

Solución	Concentración (g/L)	Suministro por kg de suelo (ml)	Concentración final aplicada (mg)	
I	K ₂ SO ₄	61.72	6	60
II	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	25	3	30
III	MnSO ₄ · H ₂ O	3.5	3	30
	ZnSO ₄ · H ₂ O	1.8		
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.7		
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.06		
IV	NH ₄ NO ₃ *	95.24	6*	210
V	KH ₂ PO ₄ *	43.93	6*	210
VI	MgSO ₄ · 7H ₂ O	135.14	3	30

*1 ml de solución es igual a 10 mg de N o P

6.1.4. Condiciones experimentales

Se sembró maíz el día 9 de septiembre del 2016 en macetas en invernadero. El primer riego fue de 150 ml de agua de la llave. Posteriormente a las unidades experimentales se irrigaron al 80% de la capacidad de campo de humedad del sustrato. En la novena semana de crecimiento se cosechó (11 de noviembre del 2016).

En la cosecha, se separaron el follaje de las raíces de todas las plantas. Las raíces fueron conservadas en congelación a -20°C para conservar la colonización de HMA. La parte aérea se colocó en el horno de secado a 70° C por 48 horas.

6.1.5. Variables medidas

Se analizaron variables respuesta tanto en la parte aérea como en las raíces y durante el desarrollo de las plantas y a posteriori la fase experimental (Cuadro 3).

Cuadro 3. Variables medidas del desarrollo de las plantas y HMA

	<i>Variable</i>	<i>Unidades</i>	<i>Equipo/Método</i>
Parte aérea	Peso seco	gramos (g)	SPAD 502
	Reflectancia		
	Altura de individuo	centímetros (cm)	
	Deficiencia de P	porcentaje (%)	
Raíces	Peso seco	gramos (g)	Giovanetti & Mose 1980
	Colonización		

Deficiencia de P: La deficiencia del fósforo en el maíz, puede observarse con una coloración púrpura en las hojas de la planta. Para evaluar el déficit de P en el desarrollo del maíz, se establecieron categorías de deficiencia con base en la coloración púrpura de los individuos. Se establecieron cinco categorías de coloración de las hojas, se dio un 1 a las hojas que tenían coloración verde, mientras que el 5 fue coloración púrpura casi en la totalidad de la hoja (Cuadro 4 y Figura 3):

Cuadro 4. Deficiencia de fósforo

Porcentajes de deficiencia	Valor
0-20%	1
21-40%	2
41-60%	3
61-80%	4
81-100%	5

Medidor de reflectancia SPAD 502: Es un medidor de tamaño compacto que mide la cantidad de clorofila presente en las hojas de las plantas. El equipo, determina la cantidad relativa de la clorofila presente en la hoja mediante la absorbancia en regiones de longitud de onda ultravioleta. Los valores obtenidos

están en unidades de SPAD. La reflectancia de cada planta se tomó a la mitad de la hoja más joven y sana de cada unidad experimental.

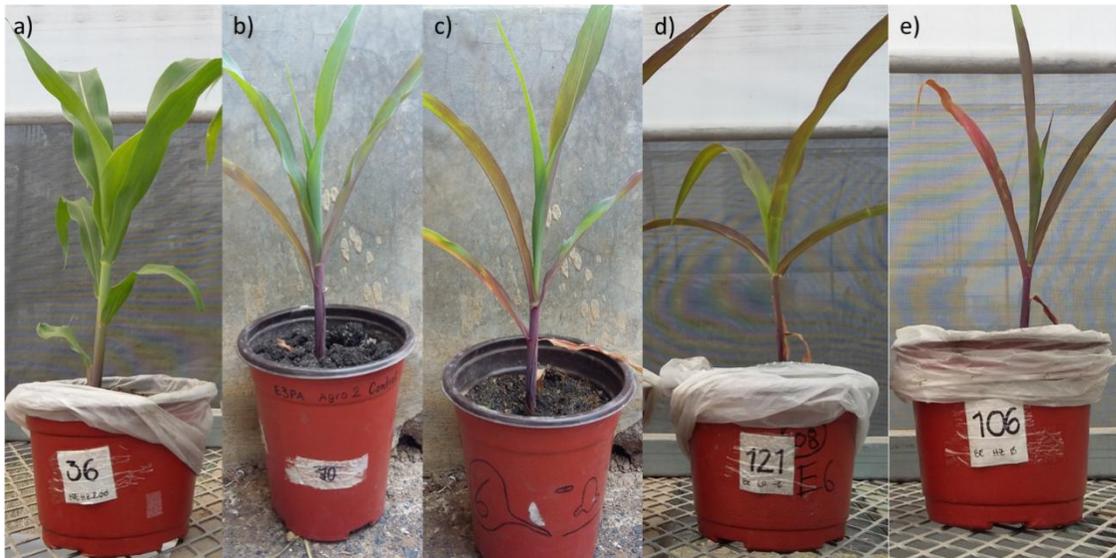


Figura 3. a) 0 a 20% de déficit de P; b) 21 a 40% de déficit de P; c) 41 a 60% de déficit de P; d) 61 a 80% de déficit de P; e) 81 a 100% de déficit de P

6.1.6. Estimación del porcentaje de colonización micorrízica

Para estimar el porcentaje de HMA presente en las raíces del maíz, se modificó el método de Phillips y Hayman (1970), donde se tiñó una muestra de 1.5 a 2 g de raíz por unidad experimental. Las raíces fueron previamente cortadas y aleatorizadas en segmentos de no más de 1 cm (Figura 4 y Figura 5):

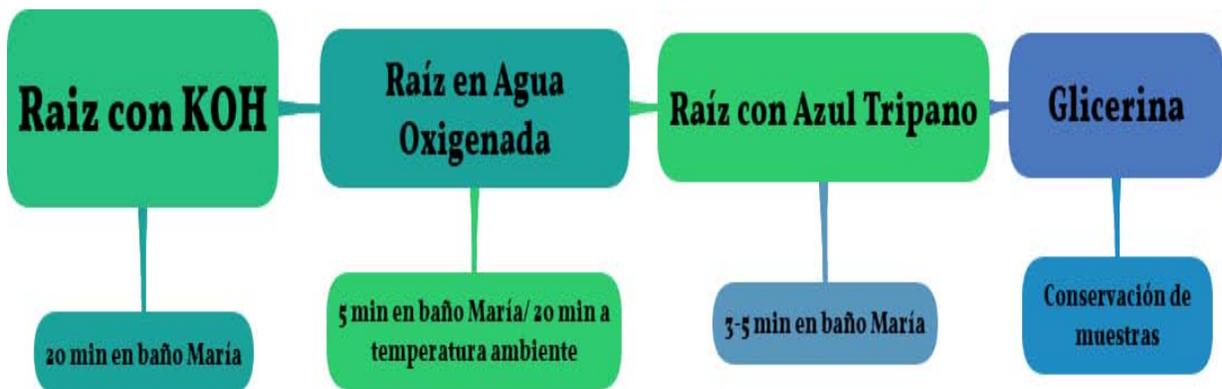


Figura 4. Procedimiento de tinción de raíces



Figura 5. Procedimiento de tinción de raíces ilustrado

Para estimar la colonización micorrízica se siguió el método de Giovanetti y Mosse (1980), mediante el cual se observó cada muestra de raíces teñidas dentro de una caja de Petri. El método se basa en la cuantificación de la ausencia o presencia de HMA en las raíces de las plantas. La cuantificación se realizó siguiendo una línea dibujada en la caja Petri y solo fueron consideradas las raíces que se intersectaron en la línea.

6.1.7. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizó una ANOVA multifactorial de 3 factores con una $p \leq 0.05$. Para conocer los grupos homogéneos de los tratamientos se utilizó una prueba mínima significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0.05$). Todos los análisis se realizaron con el Software Statgraphics Centurion XVI y las gráficas en el software GraphPad Prism 5.0. Además se realizó un análisis de Kruskal-Wallis en el software InfoStat, para conocer el efecto de la fertilización sobre la deficiencia de P en las planta.

6.2. SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL

En esta fase experimental se tuvo con objetivo evaluar el aporte de los HMA nativos en la nutrición de una variedad de maíz susceptible a deficiencia de fósforo

6.2.1. Diseño experimental

Para la realización de la segunda fase experimental diseño un experimento con dos factores y un genotipo de maíz sensible a deficiencia de fósforo (Cuadro 5):

Cuadro 5. Diseño experimental, segunda fase

FACTOR	NIVEL	TOTAL
HMA	-Estéril con filtrado (Sin HMA) -Estéril con inóculo de HMA nativos al 25%	2
Fertilización	-0 mg de P con micro y macronutrientes -50 mg de P con micro y macronutrientes -100 mg de P con micro y macronutrientes	3
TRATAMIENTOS		6
UNIDADES EXPERIMENTALES		30

6.2.2. Materiales biológicos

Para esta fase experimental se utilizó el genotipo de maíz híbrido CRM-52. Es un maíz híbrido de la casa semillera *Híbridos Rústicos y Sanos*, filial de *Monsanto*. El maíz cuenta con características sobresalientes para el funcionamiento agrícola. Es de ciclo intermedio-tardío, de 90 días para la floración y 190 días para llegar a la madurez. Es una planta de porte intermedio, pero puede llegar a medir hasta 2.50 metros, de hoja angulada y espiga morada abundante. Además puede desarrollar de 16 a 18 hileras de granos (INIFAP, 2006). En investigaciones previas desarrolladas en el Laboratorio de Agroecología se identificó que éste genotipo presenta susceptibilidad y reducción del crecimiento vegetativo cuando hay deficiencia de fósforo en el suelo.

6.2.3. Preparación del sustrato y fórmula de fertilización

La preparación del sustrato fue la misma que para la primera fase experimental, es decir, sustrato compuesto por suelo de la localidad Cantabria y arena porción 1:1 (v/v). También se les aplicó la misma cantidad de las soluciones nutritivas desarrolladas por el Laboratorio Nacional Riso de Dinamarca (Cuadro 2).

6.2.4. Condiciones experimentales

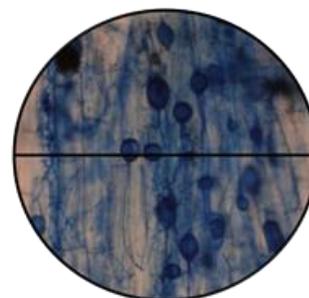
La duración del experimento fue del 30 de enero hasta el día 7 abril (9 semanas de crecimiento de las plantas) del 2017. Las plantas crecieron en invernadero. Se cosecharon y procesaron las muestras para medir las variables de respuesta en la forma descrita en la fase experimental uno.

6.2.5. Variables medidas

En ésta fase experimental se analizaron las variables descritas en la fase uno (Cuadro 3). El método de estimación de colonización micorrízica para esta fase experimental fue mediante el método de McGonigle *et al.* (1990)

Método de	McGonigle
Raíces	1
Hifas	Incontables
Vesículas	2
Arbúsculos	0

El método de McGonigle *et al.* (1990) permite la estimación del porcentaje de crecimiento de los HMA por estructuras, es decir, se estimó el crecimiento de hifas, vesículas, arbúsculos y otras estructuras de forma independiente. Para este método fue necesario montar en porta objetos 20 segmentos de raíces de 1.2 centímetros. Los porta objetos fueron observados siguiendo una línea en un microscopio óptico a una aumento de 10X línea horizontal “stagegraticule” como criterio para contabilizar la presencia o ausencia de estructuras (Figura 6;**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



Método de	McGonigle
Raíces	1
Hifas	Incontables
Vesículas	2
Arbúsculos	0

Figura 6. Método de estimación micorrízica de McGonigle 1990.

6.2.6. Estimación de N y P en la parte aérea del maíz

Además se estimó el contenido de N y P en el follaje de las plantas como elementos indicadores del estado nutricional de la plantas. Las muestras de material vegetal se molieron y tamizaron en una malla N°40 de 0.425mm. Esta estimación de N y P se realizó en 2 fases: digestión ácida y cuantificación de colorimetría (Figura 7).

Para la digestión ácida, se pesaron 0.25 g de la muestra para colocarse en tubos digestores de 75 ml. Se le adicionó 1.1 g de mezcla digestora molida hasta polvo fino en relación 1:10 CuSO₄ y de K₂SO₄. Bajo una campana de extracción, se agregó lentamente 3 ml de peróxido de hidrógeno al 30% más 7 ml de ácido sulfúrico concentrado. Las muestras se taparon con papel aluminio y se mantuvieron en este estado de pre digestión por 12 horas.

Posteriormente se colocaron en un bloque digestor con incrementos graduales de temperatura cada 20 minutos hasta alcanzar 375° C durante 190 minutos. Al término de este tiempo, los tubos se levantaron del bloque para enfriarse. Una vez frías las muestras, se les adicionó lentamente agua desionizada con una piceta hasta llenar un tercio del volumen del tubo. Después de 30 minutos, se lleva al volumen final del tubo con agua desionizada. Se colocaron tapones de corcho y se agitaron manualmente hasta homogenizar la muestra para su posterior extracción.

Para la extracción de las muestras, se filtraron a través del papel Whatman No. 1 de 125 mm. El extracto se recuperó en un vial de vidrio de 15 ml, llenándolo a $\frac{3}{4}$ de su capacidad para la posterior cuantificación colorimétrica de N y P totales. Se almacenaron a 4°C por no más de un mes. Cuando las muestras fueron

almacenadas, estas se homogenizaron con un agitador EBERBACH a 300 rpm por 30 minutos antes de leerse o realizar diluciones en caso necesario.

Cuantificación del N y P totales

La cuantificación de N y P totales se realizó a 660 nm, mediante el método colorimétrico de hipoclorito fenol de Murphy y Riley, (1962). En un autoanalizador 3, BRAN LUEBBE de acuerdo al manual TECHNICON AUTOANALYZER II, por el método No. 696-82W (Figura 7).



Figura 7. Preparación de diluciones para análisis en el colorímetro

6.2.7. Análisis estadísticos

Para la fase dos, se utilizó un ANOVA de 2 vías con una $p \leq 0.05$. Para identificar los grupos homogéneos de los tratamientos se utilizó una Prueba Mínima Significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0.05$). Para realizar los análisis estadísticos y la construcción de gráficas se utilizaron los mismos softwares descritos en la fase uno.

7. RESULTADOS

Los resultados obtenidos para esta tesis se presentan en dos fases experimentales. De manera tal que cada fase está enfocada en cada uno de los objetivos particulares.

7.1. Primera fase experimental

Dentro de esta fase experimental se evaluó el efecto en el crecimiento de diferentes genotipos de maíz en presencia y ausencia de HMA nativos bajo un gradiente de fertilización fosfatada.

Los valores del análisis de varianza para esta fase experimental se presentan en el Cuadro 6. La reflectancia fue influenciada significativamente por las tres interacciones dobles de los factores HMA, fertilización y genotipo. La interacción de los factores fertilización y HMA tuvieron un efecto significativo sobre el seco aéreo, de raíz y total. La altura fue promovida por las interacciones genotipo-HMA y fertilización-genotipo. Solo la fertilización influenció la colonización de HMA en las raíces (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cuadro de p de la primera fase experimental

	Reflectancia	Altura	Peso aéreo	Peso total raíz	Peso total	Peso raíz/peso aéreo	%Colonización
EFFECTOS PRINCIPALES							
A:Fertilización	*	*	*	*	*	*	*
B:Genotipo	*	*	*	0.1326	*	*	0.1039
C:HMA	0.9269	0.9378	*	*	*	*	
INTERACCIONES							
AB	*	*	0.5159	0.1586	0.4339	0.0645	0.9337
AC	*	0.7251	*	*	*	0.1844	
BC	*	*	0.1285	0.8116	0.488	0.1072	
ABC	0.0686	0.3803	0.7276	0.7032	0.7581	0.5588	

Reflectancia como medida de fotosíntesis

Las dosis de fertilización mineral promovieron significativamente más reflectancia que los tratamientos sin fertilización y con fertilización sin fósforo. Todos los niveles de fertilización fosforada fueron estadísticamente similares. La línea mejorada tuvo una mayor reflectancia que el maíz Chalqueño solo en presencia de fertilización fosforada. En general los tratamientos con limitación de fósforo tuvieron estadísticamente la misma reflectancia en los tres genotipos de maíz (Figura 8; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.a**).

Los microorganismos rizosféricos estimularon una mayor reflectancia cuando fueron inoculados en un suelo con limitación de fósforo, sin embargo, la aplicación de la fertilización fosforada no incrementó la reflectancia de las plantas con microorganismos. Todos los tratamientos de fertilización con microorganismos presentaron estadísticamente la misma reflectancia, con excepción del tratamiento de fertilización sin fósforo. El fosfato mineral estimuló la reflectancia de las plantas con fungicida, además sin inóculo y fertilizadas con 50 y 200 mg/P tuvieron más reflectancia que sus homólogos con HMA (Figura 8b).

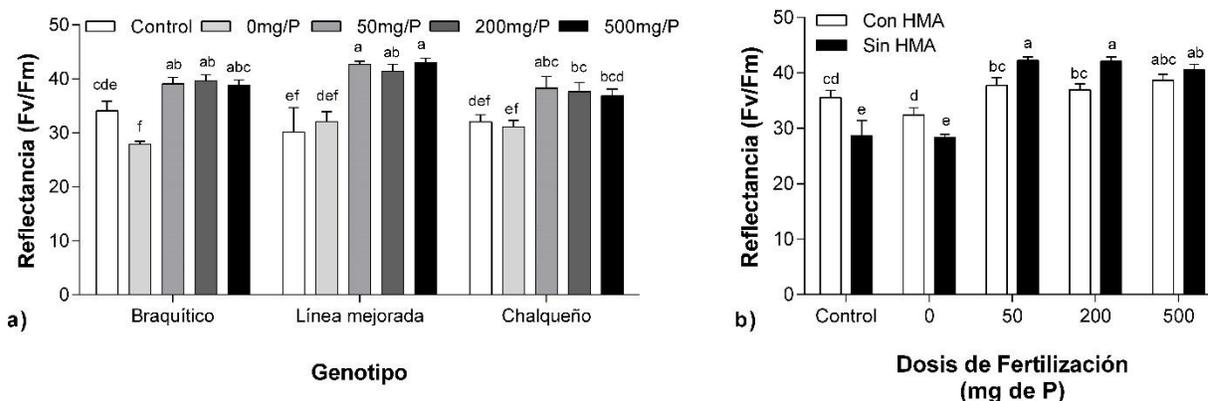


Figura 8. Efecto de la interacción entre fertilización-genotipo (a) y genotipo- HMA (b) sobre la reflectancia de las plantas de maíz. Se presenta la media con barras de error estándar estimados a partir de $n=5$ y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

Altura de la planta

La fertilización mineral promovió el crecimiento de todos los genotipos de maíz, pero entre los tratamientos de 200 y 500 mg/P no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo el Chalqueño tuvo mayor altura que los genotipos mejorados (Figura 9; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**a). La altura final de las plantas no se vio afectada por la presencia o ausencia de HMA nativos, pero el Chalqueño tuvo significativamente la mayor altura de los tres genotipos de maíz (Figura 9b).

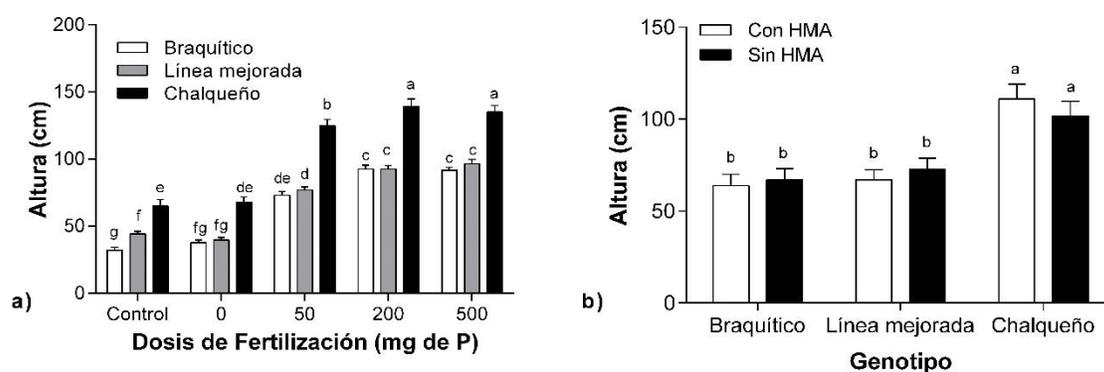


Figura 9. Efecto de la interacción entre fertilización-genotipo (a) y genotipo- HMA (b) sobre la altura de las plantas de maíz. Se presenta la media con barras de error estándar estimados a partir de n=5 y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

Variables de crecimiento vegetal

En general, la fertilización promovió el crecimiento de las plantas de maíz. El peso seco aéreo se incrementó conforme aumento la dosis de fertilización fosforada, pero no hubo diferencias en presencia o ausencia de HMA (Figura 10; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**a).

La presencia de microorganismos rizosféricos estimuló el crecimiento de las raíces sólo en los tratamientos con 50 y 200 mg/P, mientras que con limitación de fósforo los HMA no promovieron el desarrollo de las raíces (Figura 10; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**b). La dosis de fertilización con 50 mg/P fue el único tratamiento en el que los microorganismos nativos promovieron el

crecimiento del maíz (Figura 10; Error! No se encuentra el origen de la referencia.c).

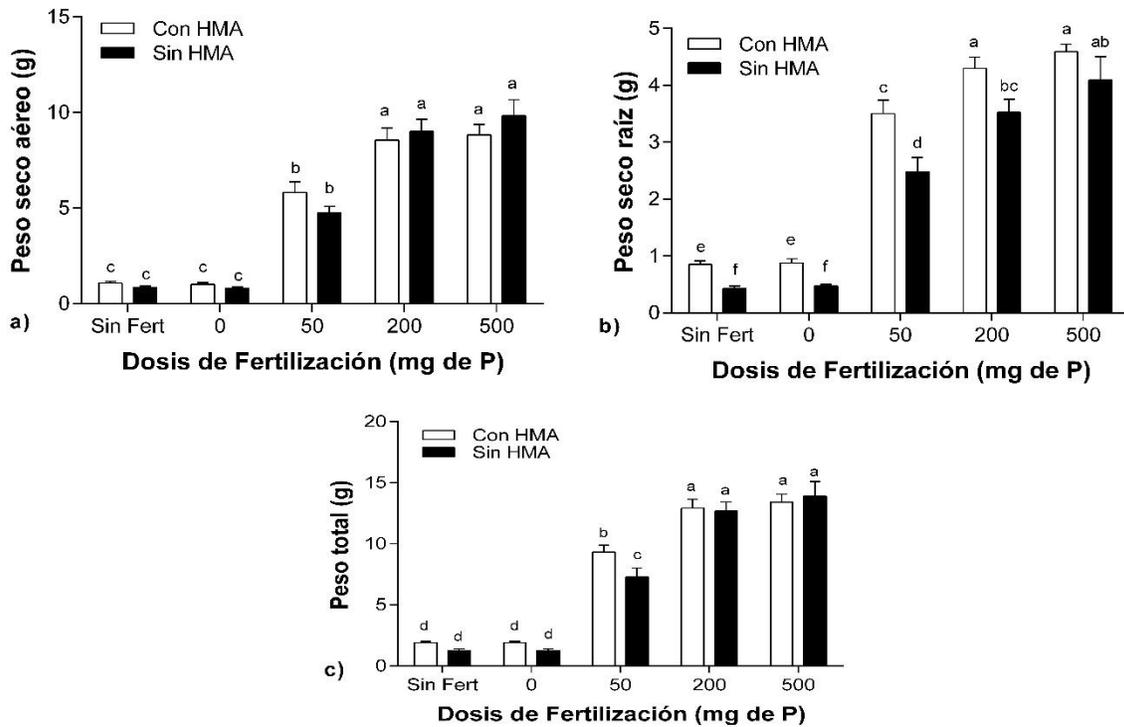


Figura 10. Efecto de la interacción dosis de fertilización-HMA sobre el peso seco aéreo (a), peso seco de la raíz (b) y peso total (c) de las plantas de maíz. Se presenta la media con barras de error estándar estimados a partir de n=5 y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

Relación entre peso de la raíz y parte aérea

La relación entre el peso de la raíz y de la parte aérea de la planta estuvo influenciada por los factores de manera independiente (

Cuadro 6). La fertilización fosforada estimuló más el desarrollo de la parte aérea que el de las raíces (Figura 11; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**a). Mientras que los genotipos híbridos son los que se vieron beneficiados en esta relación (Figura 11b). Y la presencia de HMA también contribuye a que el follaje de la planta sea mayor que el de la raíz (Figura 11c).

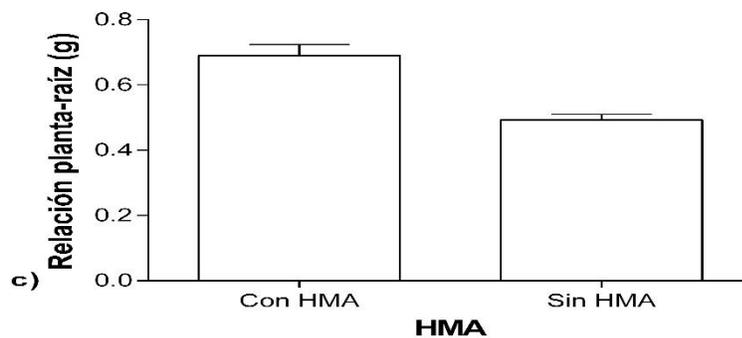
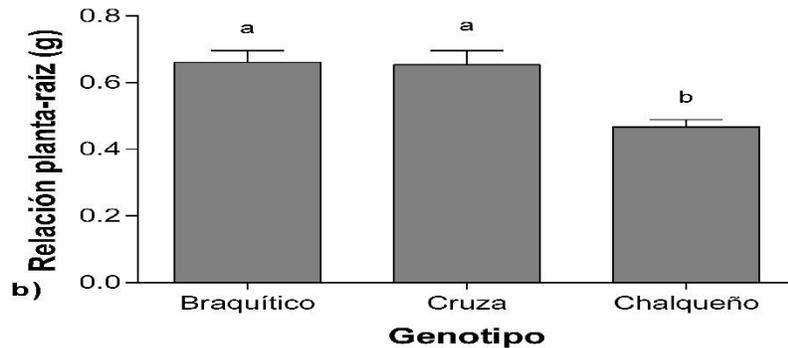
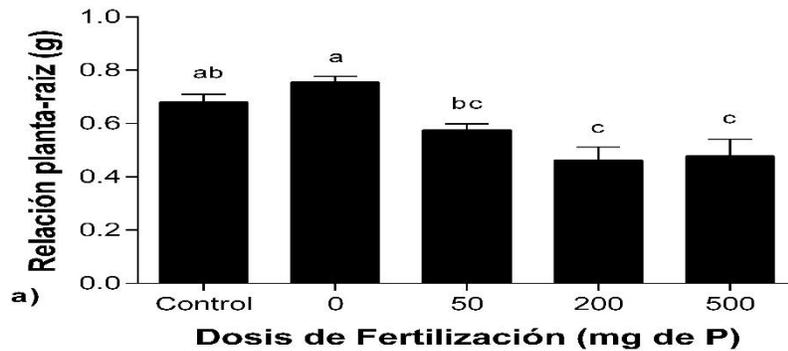


Figura 11. Efecto de los factores principales en la relación entre el peso de la parte aérea con el peso de la raíz. Se presenta la media con barras de error estándar estimados a partir de $n=5$ y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

Porcentaje de colonización micorrízica

Para el porcentaje de colonización de hongos en las raíces del maíz, se encontró una tendencia general en la que a mayor concentración de fertilización fosforada, menor fue la colonización de HMA. Sin embargo, el exceso de fertilización no eliminó la colonización de HMA en las raíces del maíz (Figura 12).

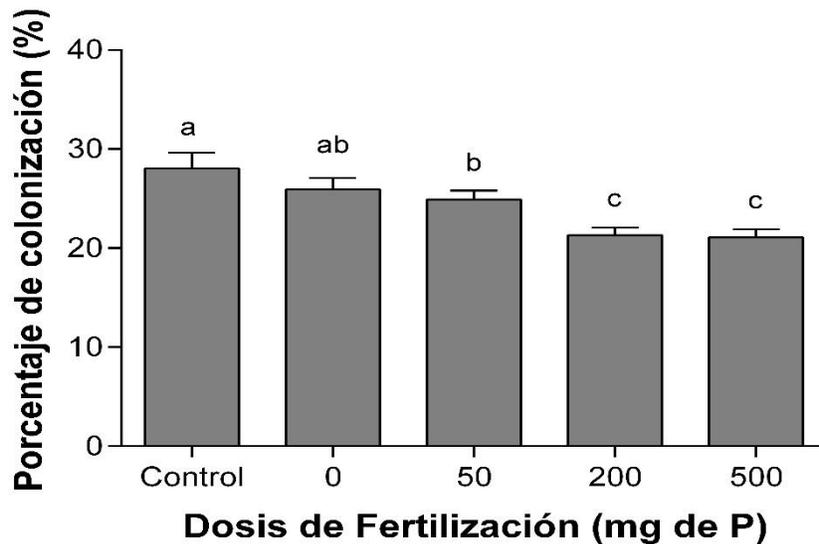


Figura 12. Efecto de la dosis de fertilización en el porcentaje de colonización de HMA en las raíces del maíz. Se presenta la media con barras de error estándar estimados a partir de $n=5$ y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

Deficiencia de fósforo en las plantas de maíz

A los 35 días de crecimiento, sólo las plantas de maíz que crecieron sin fertilización (control) y con fertilización sin fósforo presentaron síntomas de deficiencia de fósforo. El genotipo Chalqueño presentó los mayores síntomas de deficiencia de fósforo, seguido de la línea mejorada y finalmente el híbrido braquítico, quién solo presentó leves muestras cuando no se aplicó ningún fertilizante (Figura 13a). Sin embargo, todos los genotipos de maíz mostraron una reducción de los síntomas de deficiencia de fósforo con forme pasó el tiempo de crecimiento. Además, fue posible observar que los HMA tuvieron un efecto diferente entre los distintos genotipos de maíz. A partir de los 49 días de

crecimiento, la raza de maíz Chalqueño mostró un incremento de los síntomas de deficiencia de fósforo cuando se inoculó con HMA nativos, en contraste, la simbiosis micorrízica redujo la coloración púrpura de las hojas de la línea mejorada de maíz. Por su parte, el híbrido braquítico mostró la menor deficiencia de fósforo en todos los niveles de fertilización, así mismo, la inoculación de HMA no mostró un efecto claro en cuando a la reducción de síntomas de deficiencia de fósforo (Figura 13b, Figura 13c, Figura 14).

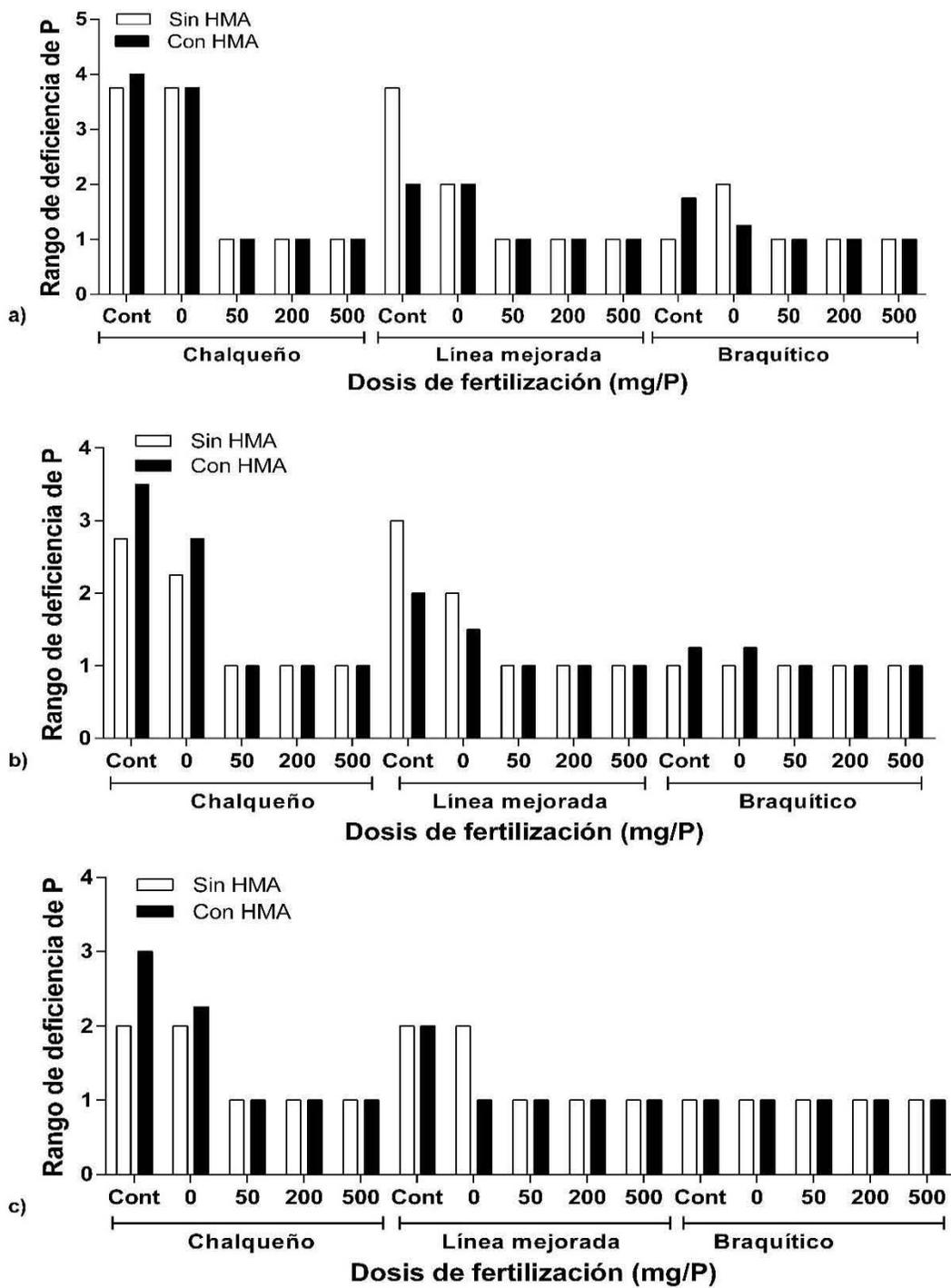


Figura 13. Efecto de la dosis de fertilización en el crecimiento de las plantas en los días 35(a), 49(b) y 63(c). Se presenta la media a partir de n=5 y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

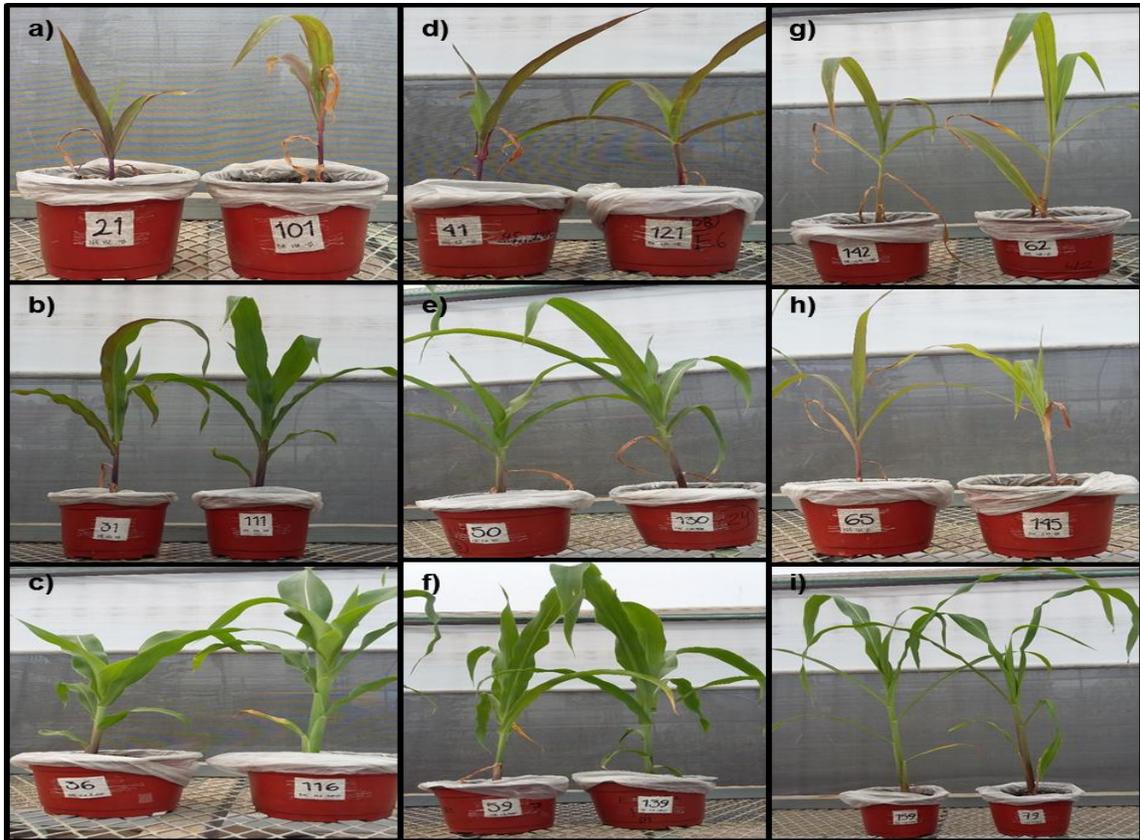


Figura 14. Efecto de tres tratamientos de fertilización (control, 50mg/p y 500mg/p; de arriba abajo) y los tres genotipos de maíz (chalqueño, línea mejorada y braquítico de derecha a izquierda) a las 11 semanas de desarrollo. a), d) y g) Tratamientos con un fuerte síntoma de deficiencia de fósforo; e), h) e i) Tratamientos con síntoma promedio de deficiencia de fósforo; b), c) y f) Tratamientos con un débil síntoma de deficiencia de fósforo.

SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL

Dentro esta fase experimental se evaluó el aporte de los HMA nativos en la nutrición de una variedad de maíz susceptible a deficiencia de fósforo.

Los valores del análisis de varianza para esta fase experimental se presentan en el Cuadro 7. La altura y pesos secos de la planta fueron influenciados significativamente por la fertilización. Así mismo, el contenido de fósforo y nitrógeno en planta y el fósforo por gramo de materia seca también respondieron significativamente a la fertilización. La altura de las plantas fue la única variable respuesta que tuvo un efecto significativo para ambas variables sin interacción. Finalmente la relación entre el peso seco de raíz entre el peso seco aéreo y la colonización de HMA no variaron entre ningún tratamiento de los factores fertilización o HMA (Cuadro 7).

Cuadro 7. Cuadro de *p* de la segunda fase experimental

Fuente	Reflectancia	Altura	Peso aéreo	Peso total raíz	Peso total	Raíz/tallo	% Colonización	N en planta	P en planta	N/g de maíz	P/g de maíz
EFECTOS PRINCIPALES											
A: Fertilización	*	*	*	*	*	0.0729	0.2802	*	*	0.1374	*
B:HMA	0.5174	*	0.1747	0.3316	0.1997	0.6244		0.0748	0.8636	0.0764	0.2817
INTERACCIONES											
AB	0.0912	0.324	0.4262	0.579	0.4363	0.3189		0.6146	0.8249	0.502	0.151

VARIABLES DE CRECIMIENTO VEGETAL

Se encontró un patrón general en la mayoría de las variables de respuesta del crecimiento vegetal, en donde la aplicación de fósforo mineral promovió un mayor crecimiento de las plantas de maíz. Sin embargo, la diferencia de crecimiento entre las plantas fertilizadas con 0 y 50 mg/P fue mayor que la diferencia entre 50 y 100 mg/P (Figura 15a y Figura 18).

La reflectancia se incrementó conforme aumentó la dosis de fertilización (Figura 15b). El peso seco aéreo (Figura 15c), el peso seco de raíz (Figura 15d) y el peso total de las plantas de maíz (Figura 15e) tuvieron un patrón de crecimiento similar a las anteriores variables, donde a mayor dosis de fertilización mayor fue el desarrollo de estas variables de respuesta.

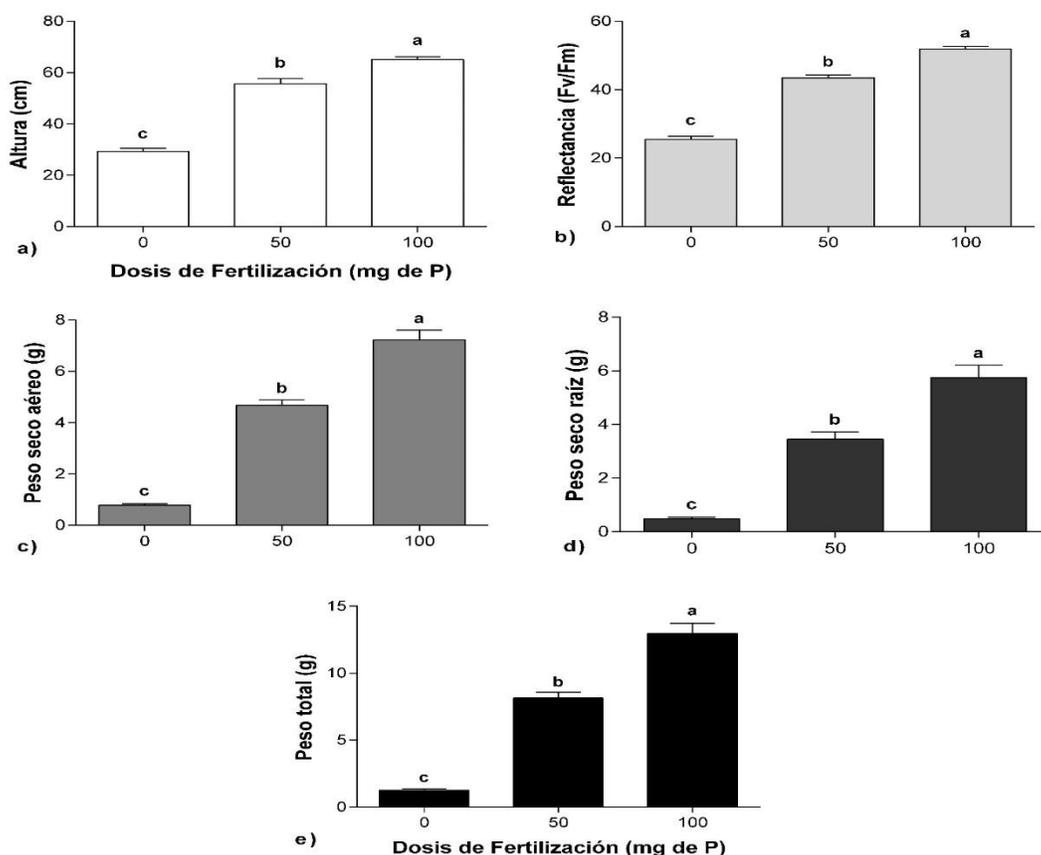


Figura 15. Efecto de las dosis de fertilización en el crecimiento de la planta de maíz. Reflectancia (a), Altura (b), Peso seco aéreo (b), peso seco de raíz (c) y peso total (d). Se presenta la media con barras de error estándar estimadas a partir de $n=5$ y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

Nitrógeno y fósforo en parte aérea de la planta

Se encontró una tendencia general en la respuesta de la cantidad de nitrógeno y fósforo en el follaje de las plantas de maíz. En donde a mayor concentración de fertilización fosforada, mayor fue la concentración de nutrientes en la parte aérea de las plantas de maíz (Figura 16a y Figura 16b). La dosis de fertilización tuvo un efecto significativo en la cantidad de fósforo en un gramo de materia seca. Cuando mayor fue el nivel de fertilización, mayor fue la concentración de fósforo por gramos de materia seca, sin embargo en los tratamientos con limitación de fósforo y 50 mg/P hubo menor cantidad de dicho nutriente (Figura 16c).

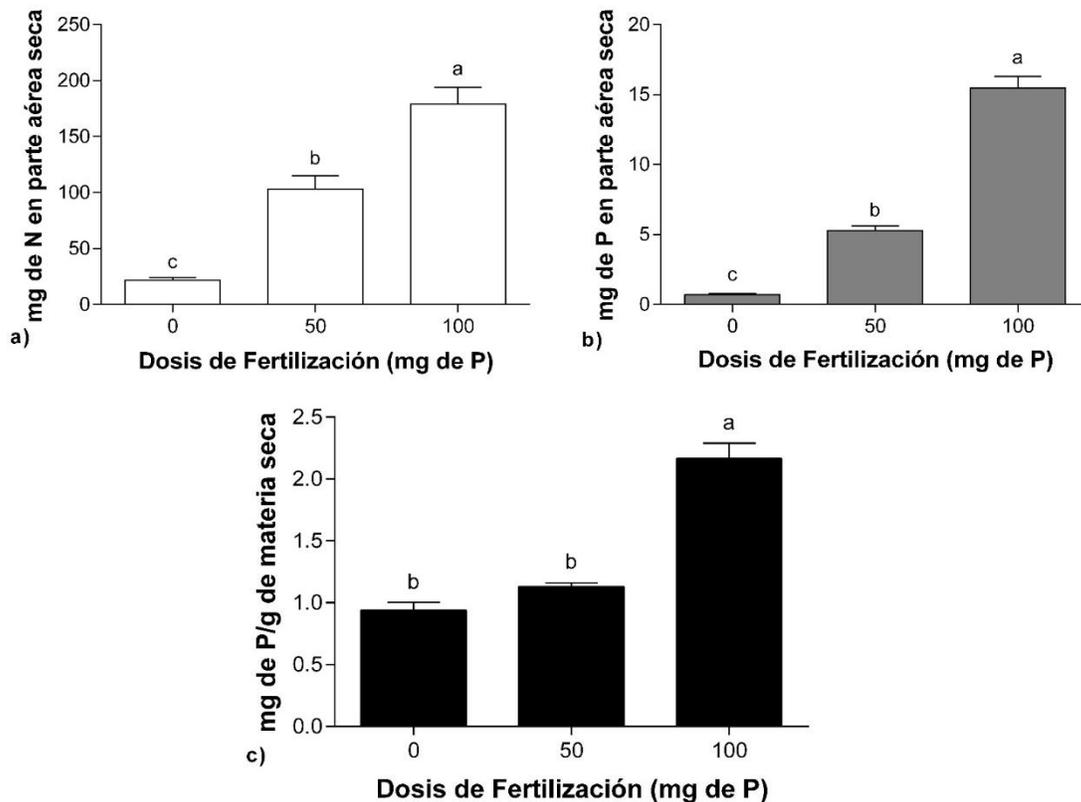


Figura 16. Efecto de la dosis de fertilización en la cantidad de N y P presente en la planta de maíz. Mg de N/parte aérea (a), mg de P/parte aérea (b) y mg de P/g de materia seca (c). Se presenta la media con barras de error estándar estimadas a partir de $n=5$ y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

Deficiencia de fósforo en las plantas de maíz

Los HMA estimularon una mayor deficiencia de fósforo en las plantas que crecieron con fertilización sin fósforo (0) a los 35, 49, 63 días de crecimiento. Por su parte, la fertilización que incluyó 50 mg/P presentó coloración púrpura en las hojas de maíz solo en las últimas dos fechas de muestreo. Las plantas fertilizadas con 100 mg/P nunca presentaron síntomas de limitación de nutrientes (Figura 17a, Figura 17b y Figura 17c y Figura 18).

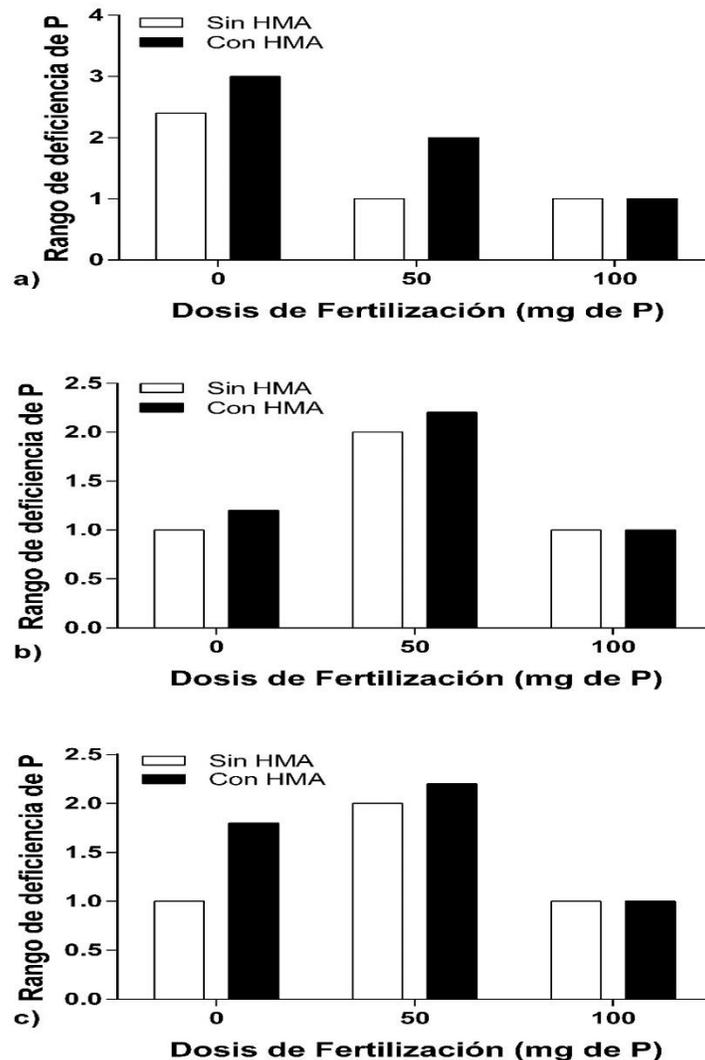


Figura 17. Efecto de la dosis de fertilización en el crecimiento de las plantas en la semana 1(a), 3(b) y 5(c). Se presenta la media a partir de $n=5$ y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

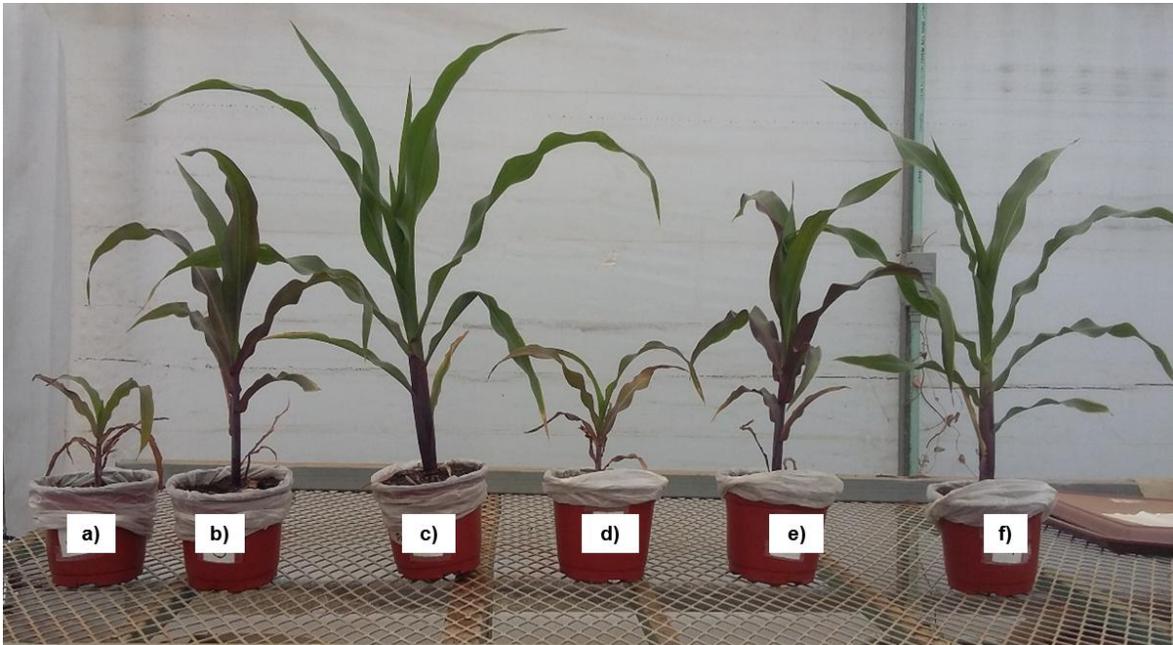


Figura 18. Efecto de los tratamientos de fertilización (control, 50mg/p y 100mg/p) en el desarrollo del maíz a las 11 semanas de crecimiento. a) Planta con 70-100% de deficiencia en P; b) Planta con 30-70% de deficiencia de P y c) Planta con 0-30% de deficiencia de P; sin HMA. d) Planta con 70-100% de deficiencia en P; e) Planta con 30-70% de deficiencia de P y f) Planta con 0-30% de deficiencia de P; con HMA.

Colonización de hifas micorrízicas

Descripción de cuadro de P

	No colonizadas	Arbúsculos	Hifas	Vesículas	Otros
EFFECTOS PRINCIPALES					
Fertilización	0.1234	0.2915	0.0103	0.5272	0.0487

El porcentaje de colonización micorrízica de las raíces estimado para el número de hifas, se incrementó con la aplicación de la fertilización fosforada. Sin embargo, ambos tratamientos de fertilización tuvieron la misma colonización estadísticamente (Figura 19a).

Por otro lado, el número de vesículas y arbúsculos fueron estadísticamente similares en todos los niveles de fertilización. Finalmente el porcentaje de

presencia de otras estructuras presentes en las raíces, fue estadísticamente mayor cuando las plantas se desarrollaron sin ningún fertilizante fosforado (Figura 19b).

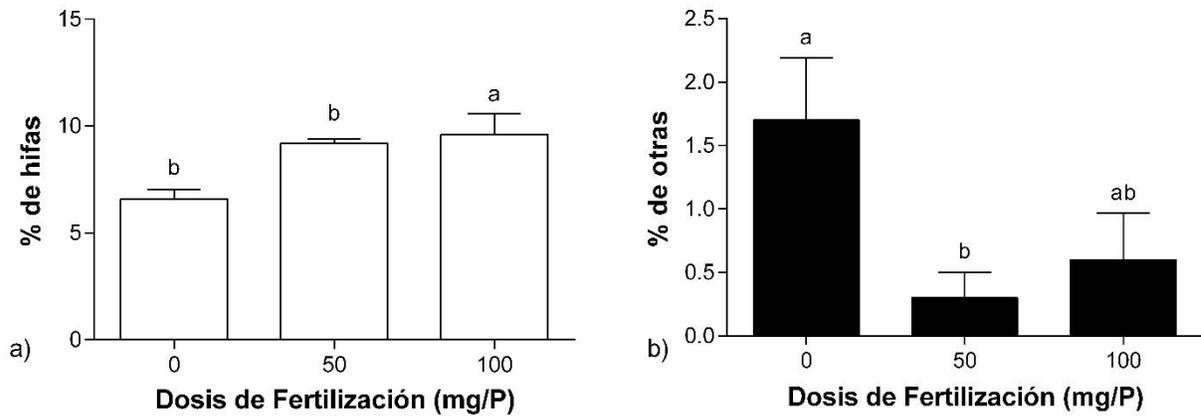


Figura 19. Efecto de la dosis de fertilización sobre el porcentaje de colonización de hifas micorrízicas (a) y la colonización de otros microorganismos (b) en las raíces del maíz. Se presenta la media con barras de error estándar estimados a partir de $n=5$ y una prueba de LSD con $p \geq 0.05$.

8. DISCUSIÓN

La fertilización mineral fue el factor que tuvo mayor influencia en el crecimiento de las plantas de maíz y en el establecimiento de la simbiosis micorrízica. Los HMA promovieron el desarrollo de maíz bajo condiciones limitantes de fósforo, es decir, bajo dosis reducidas de fertilización fosforada. Además, los HMA tuvieron un efecto similar en los tres genotipos de maíz con respecto a la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas. Por lo tanto, se acepta de forma parcial la hipótesis planteada dado que los HMA nativos de la Ciénega de Zacapu promovieron el crecimiento de las plantas, pero su efecto fue independiente al genotipo de maíz y dependiente de la fertilización fosforada.

Los HMA en relación a la deficiencia de fósforo en el crecimiento del maíz

El fósforo es un elemento limitado a la intemperización de la roca madre, a la solubilización de compuestos no asimilables y a la mineralización de la materia orgánica y de la biomasa microbiana (Walker & Syers 1976; Richardson & Simpson, 2011). Por lo tanto es común que el fósforo sea el nutriente más limitante para el desarrollo de las plantas, puesto que un suelo puede tener mucho fósforo total pero éste puede estar ocluido en arcillas, materia orgánica, biomasa microbiana o compuestos que no son absorbibles por las plantas (Tapia-Torres & García-Oliva 2013).

Lo anterior concuerda con el bioindicador de deficiencia de fósforo en maíz (coloración púrpura de las hojas), quien mostró que dicho nutriente fue quien limitó el desarrollo de las plantas independientemente del genotipo evaluado. El maíz puede seguir cuatro estrategias fisiológicas y metabólicas para amortiguar a la limitación de fósforo: incremento de la síntesis de exudados, reabsorción del fósforo metabólico, modificar la arquitectura de las raíces e incrementar la simbiosis micorrízica (Calderón-Vázquez et al., 2009). En este sentido, se observó un aumento del peso seco de las raíces en presencia de HMA, lo que permite suponer que la colonización micorrízica también modificó la arquitectura de las raíces con el fin de incrementar la absorción de fósforo (Atkinson et al., 1994).

La deficiencia de fósforo observada en las hojas en ambos experimentos se redujo conforme transcurrió el tiempo de crecimiento de las plantas. Este efecto puede ser explicado por la capacidad de los diferentes genotipos para sintetizar exudados que regularon el pH del sustrato y por ende la liberación del fósforo ocluido en compuestos de calcio y fierro (Calderón-Vázquez et al. 2009).

Finalmente, Chu et al. (2013) encontraron que los HMA pueden estimular tres respuestas de crecimiento de maíz: 1) positivo cuando hay deficiencia de fósforo, pero negativo en altas concentraciones de fósforo 2) neutral independientemente del fósforo y 3) positivo independientemente del fósforo. Dichos resultados concuerdan con los indicadores de deficiencia de fósforo presentados, donde la colonización micorrízica tuvo un efecto benéfico en la línea mejorada, mientras que, la raza Chalqueño desarrolló más síntomas de deficiencia de fósforo en presencia de HMA.

Relación de la fertilización con el desarrollo de HMA nativos

La fertilización puede ser un elemento ambiental que modifica la simbiosis micorrízica en agroecosistemas (Thomson et al. 1992; Bhadalung et al. 2005). Los resultados presentados indicaron que la colonización micorrízica en las raíces de las plantas de todos los genotipos evaluados depende de la dosis de fertilización fosforada. Se ha propuesto que hay una adaptación de las poblaciones de HMA en las prácticas de manejo agrícola del suelo de origen, por ejemplo la fertilización mineral (López-Carmona et al., enviado).

En general, los HMA nativos estudiados beneficiaron a sus hospederos en dosis de fertilización bajas. En contraste cuando no hubo fertilización o cuando se sobre fertilizó no se observaron diferencias entre las plantas inoculadas y sin inóculo. En el primer experimento, el crecimiento de los HMA estimado como el porcentaje de colonización intraradical se redujo conforme se incrementó las dosis de fósforo. Sin embargo, el tratamiento con 500mg/P no eliminó la colonización de HMA. Al respecto Treseder y Allen (2002) desarrollaron un modelo donde el incremento de los nutrientes disponibles en el suelo forma una campana gaussiana con respecto de la acumulación de biomasa de HMA. Sin embargo, es probable que algunas

especies de HMA de la Ciénega de Zacapu estén adaptadas a las prácticas de fertilización fosforada y por ende, tuvieron la capacidad de mantener la simbiosis micorrízica en todos los genotipos de maíz evaluados. Esto cobra sentido, al considerar que el sitio donde se colectó el inóculo se practica una agricultura convencional con aplicaciones recurrentes de fertilizantes fosforados. Aunado a lo anterior, se ha descrito que los HMA pueden establecer una gradiente de interacciones que va desde el mutualismo al parasitismo dependiendo del ambiente y del control genético que ejercen los hospederos (Heinz et al., 2006).

En el segundo experimento, el porcentaje de colonización micorrízica fue estadísticamente similar en todos los niveles de fertilización. Sin embargo, se ha postulado que no existe una correlación entre la micorrización y el beneficio que los HMA ofrecen a sus hospederos (Smith y Read, 2008). En este sentido, se observó que la cantidad de microorganismos patógenos (*Polymixa* y *Pythium*) se redujo cuando la presencia de HMA se incrementó. Dicho efecto puede ser atribuido a que los HMA pueden promover cambios en la micorrizósfera, así como competir por el nicho con los patógenos y activar mecanismos de defensa vegetal (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).

Interacción HMA-fertilización en los diferentes genotipos de maíz

La simbiosis micorrízica puede ser influenciada por elementos del ambiente como humedad, temperatura, condiciones del suelo (Johnson et al., 2015) y prácticas agrícolas como la fertilización mineral (Larsen et al., 2014). Los resultados encontrados en la presente investigación sugieren que la fertilización es un elemento que puede modificar el tipo de interacción que establecen los HMA nativos de la Ciénega de Zacapu. En el primer experimento se observaron efectos benéficos en la reflectancia y algunas de las variables del peso seco de las plantas bajo condiciones limitantes de fósforo; pero dichos efectos fueron neutros o incluso antagónicos cuando la fertilización incluyó fósforo. Entonces limitar la aplicación de fertilizantes fosforados podría ser una estrategia que permita aprovechar los efectos de la simbiosis micorrízica y mantener un desarrollo

adecuado de las plantas de maíz con el fin de reducir el uso de fertilizantes fosforados de síntesis química.

Aunado a lo anterior, en la segunda fase experimental, evaluó una variedad susceptible a deficiencia de fósforo y se encontró un nulo efecto en la inoculación de los HMA nativos en el desarrollo y nutrición de maíz. Dichos resultados pueden ser explicados por la compatibilidad entre los HMA y sus hospederos. Diversos trabajos han mostrado que existe una compatibilidad funcional entre los HMA y el genotipo de la especie hospedera (Gavito y Varela, 1995; Klironomos, 2003; Johnson y Graham, 2013), por lo que el uso y desarrollo de variedades que permita hacer un manejo más sustentable de la nutrición de maíz (Chu et al., 2013).

Se encontró que en ambas fases experimentales, los HMA tuvieron un efecto diferente en el desarrollo de maíz, dependiendo del genotipo y de la dosis de fertilización fosforada. En relación a ello, diversos trabajos han mostrado que las interacciones micorrízicas pueden establecerse en un rango que va del mutualismo al parasitismo, y que tanto el ambiente como la fertilización mineral, puede ser un elemento que module dichas interacciones (Klironomos 2003; Johnson et al., 2006). Además se ha visto que la colonización micorrízica puede ser un elemento que puede variar entre genotipos de maíz, pero el fósforo es el elemento que modifica la presencia de HMA en las raíces (An et al., 2010).

Otro factor que puede modificar el efecto de la simbiosis micorrízica es la composición de las poblaciones de HMA en el suelo (Gryndler et al., 2006). El presente proyecto de investigación no tuvo como objeto caracterizar e identificar las poblaciones de HMA utilizadas. Sin embargo, conocer su taxonomía en conjunto con la actividad funcional podría ser un elemento que permita desarrollar prácticas agrícolas que promuevan los beneficios de los HMA nativos y por tanto, se incremente la sustentabilidad del sistema de producción de maíz de la Ciénega de Zacapu (Gianinazzi et al., 2010).

9. CONCLUSIONES

El aporte de los HMA nativos de la Ciénega de Zacapu en el desarrollo de maíz dependió de la dosis de fertilización fosforada y del genotipo de maíz con quien establecieron la simbiosis micorrízica.

La raza de maíz Chalqueño estableció una interacción negativa con los HMA nativos de la Ciénega de Zacapu cuando no se aplicó fertilización fosforada, pero la simbiosis micorrízica benefició el desarrollo de la Línea Mejorada bajo las mismas condiciones. Por lo tanto, el efecto de los HMA en el desarrollo de vegetal depende del genotipo de maíz.

La fertilización fosforada promueve que los HMA establezcan interacciones neutrales o antagónicas con los genotipos de maíz estudiados.

En exceso de fósforo no eliminó la colonización micorrízica en las raíces de todos los genotipos de maíz, por lo que es probable que algunas especies de HMA estén adaptadas a la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes fosforados.

Sin bien, los HMA no promovieron el desarrollo en el genotipo susceptible a deficiencia de fósforo, si redujeron la presencia de otros microorganismos patógenos, por lo que se comprobó que los HMA pueden tener múltiples beneficios en sus hospederos.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis propuesta ya que los HMA nativos del suelo de la Ciénega de Zacapu pueden facilitar la adquisición de nutrientes para el desarrollo vegetal, cuando hay limitación de fósforo, además el efecto final depende de la compatibilidad entre el genotipo de maíz y los HMA.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón, A. (2007). Micorriza arbuscular. *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Trillas. México, 90-119.

An GH, Kobayashi S, Enoki H, et al (2010) *How does arbuscular mycorrhizal colonization vary with host plant genotype? An example based on maize (Zea mays) germplasms*. Plant Soil Vol. 327 pp. 441–453.

Atkinson, D., Berta, G., & Hooker, J. E. (1994). Impact of mycorrhizal colonisation on root architecture, root longevity and the formation of growth regulators. In *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. pp. 89-99. Birkhäuser Basel.

Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1992). *Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms*. In Antonie van Leeuwenhoek. Vol. 81, ed. 1, pp. 343–351.

Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1997). *Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens—an overview of the mechanisms involved*. Mycorrhiza, Vol. 6, ed. 6, pp. 457-464.

Baldovinos de la Peña, G. (2002). *Desarrollo rural y transformaciones del campo*. UAEM.

Barančíková, G., Liptaj, T., & Prónayová, N. (2007). *Phosphorus fractions in arable and mountain soils and their humic acids*. Soil and water research, Vol. 2, ed. 4, pp. 141-148.

Bhadalung N, Suwanarit A, Dell B, et al (2005) Effects of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi under a maize cropping system. Plant Soil Vol. 270, pp. 371–382.

Calderón-Vázquez, C., Alatorre-Cobos, F., Simpson-Williamson, J., & Herrera-Estrella, L. (2009). Maize under phosphate limitation. In *Handbook of Maize: Its Biology*. pp. 381-404. Springer New York.

Chu, Q., Wang, X., Yang, Y., Chen, F., Zhang, F., & Feng, G. (2013). Mycorrhizal responsiveness of maize (*Zea mays* L.) genotypes as related to releasing date and available P content in soil. Mycorrhiza. Vol. 23, ed. 6, pp. 497-505.

Drinkwater, L. E., & Snapp, S. S. (2007). *Nutrients in agroecosystems: rethinking the management paradigm*. Advances in Agronomy, Vol. 92, pp. 163-186.

Espinosa, A., Tadeo, M., Turrent, A., & Gómez, N. (2008). *El potencial de las variedades nativas y mejoradas de maíz*. Ciencias, Vol. 92, pp: 118-125.

Espinoza, J.A. (2011) *Maíz, axis mundi: Maíz y sustentabilidad*. Morelos, México: Juan Pablos Editor; Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Gliessman, S. R., Rosado-May, F. J., Guadarrama-Zugasti, C., Jedlicka, J., Cohn, A., Méndez, V. E., Cohen, R., Trujillo, L., Bacon, C., & Jaffe, R. (2007). *Agroecología: promoviendo una transición hacia la sostenibilidad*. Revista Ecosistemas, Vol. 16, No. 1.

Garate A., Bonilla I. 2008. *Nutrición mineral y producción vegetal*. En: - azcón-Bieto J., Talón M. Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, pp. 143-146.

Gavito, M. E., & Varela, L. (1993). Seasonal dynamics of mycorrhizal associations in maize fields under low input agriculture. *Agriculture, ecosystems & environment*, Vol. 45, ed. 4, pp. 275-282.

Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010). *Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services*. Mycorrhiza, Vol. 20, ed. 8, pp. 519-530.

Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). *An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots*. New Phytologist, Vol. 84, pp. 489–500.

Gryndler, M., Larsen, J., Hršelová, H., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., & Kubát, J. (2006). *Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment*. Mycorrhiza, Vol. 16, ed. 3, pp. 159-166.

Gryndler, M., Larsen, J., Hršelová, H., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., & Kubát, J. (2006). *Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment*. Mycorrhiza, Vol. 16, ed. 3, pp. 159-166.

Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). *Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification*. Soil Science & Plant Nutrition, Vol. 54, pp. 33-45.

Heinz K., K., Franken, P., & Hüchelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite—what decides?. *Current opinion in plant biology*, Vol. 9, ed. 4, pp. 358-363.

Johnson, N. C., Hoeksema, J. D., Bever, J. D., Chaudhary, V. B., Gehring, C., Klironomos, J., Koide, R., Miller, R. M., Moore, J., Moutoglou, P., Simard, S., Swenson, W., Umbanhowar, J., Wilson, G., Zabinski, C. & Schwartz, M. (2006). *From Lilliput to Brobdingnag: extending models of mycorrhizal function across scales*. *BioScience*, Vol. 56, ed. 11, pp. 889-900.

Johnson, N. C., & Graham, J. H. (2013). The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant and Soil*, Vol. 363, pp. 411-419.

Kato Yamakake, T. A. (2009). Teorías sobre el origen del maíz. *Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica*, México, UNAM-Conabio, Vol. 34.

Klironomos, J.N. (2003) *Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi*. *Ecology* Vol. 84, pp. 2292–2301.

Lazos Chavero, E. (2014). *Consideraciones socioeconómicas y culturales en la controvertida introducción del maíz transgénico: el caso de Tlaxcala*. *Sociológica (México)*, Vol. 29, ed. 83, pp. 201-240.

Larsen, J., Jaramillo-López, P., Nájera-Rincon, M., & González-Esquivel, C. E. (2015). *Biotic interactions in the rhizosphere in relation to plant and soil nutrient dynamics*. *Journal of soil science and plant nutrition*, Vol. 15, ed. 2, pp. 449-463.

Larsen, J., Banuelos, J., Alarcón, A., Cruz-Sánchez, S., & Trejo, D. (2014). *Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Meloidogyne incognita* in the ornamental plant *Impatiens balsamina**. *Journal of soil science and plant nutrition*, Vol. 14, pp. 63-74.

López-Carmona, D. A., Alarcón, A., Martínez-Romero, E., Peña Cabriales, J.J. & Larsen, J. (En prensa) *Biology and Fertility of Soils*.

Lynch, J. M., & Leij, F. (1990). *Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Ltd.

Madhaiyan, M., Islam, M. R., Deka, B. H., Yim, W., Lee, G., Saravanan, V. S., Fu, Q., Hu, H. & Sa, T. (2009). *Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants*. *Journal of microbiology and biotechnology*, Vol. 19, ed. 10, pp. 1213-1222.

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(3), 495-501.

Montaño, N. M., Alarcón, A., Camargo-Ricalde, S. L., Hernández-Cuevas, L. V., Álvarez-Sánchez, J., González-Chávez, M. D. C. A., & Maldonado-Mendoza, I.

E. (2012). *Research on arbuscular mycorrhizae in Mexico: an historical synthesis and future prospects*. Symbiosis, Vol. 57, ed. 3, pp. 111-126.

Muñoz, O. A. (2005) *Centli Maíz*. 2ª ed. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. pp. 211.

Murphy, D. V., Stockdale, E. A., Brookes, P. C., & Goulding, K. W. (2007). *Impact of microorganisms on chemical transformations in soil*. In Soil Biological Fertility. pp. 37-59. Springer Netherlands.

Murphy, J. A. M. E. S., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.

Oehl, F., Sieverding, E., Mäder, P., Dubois, D., Ineichen, K., Boller, T., & Wiemken, A. (2004). *Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi*. *Oecologia*, Vol. 138, ed. 4, pp. 574-583.

Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., & Ineichen, K. (2011). *Advances in Glomeromycota taxonomy and classification*. *IMA fungus*, Vol. 2, ed. 2, pp. 191-199.

Ramos-Zapata, J., & Guadarrama, P. (2004). *Los hongos micorrizógenos arbusculares en la restauración de comunidades tropicales*. Universidad y Ciencia, Vol. 1.

Reyes M., C. A., y M. A. Cantú A. 2006. *Maíz*. In: Rodríguez B., L. A. (ed). *Campo experimental Rio Bravo: 50 años de investigación agropecuaria en el norte de Tamaulipas, Historia, logros y retos*. Libro técnico No. 1. INIFAP. México. pp. 55-74.

Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, Vol. 321, No. 1-2, pp. 305-339.

Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). *Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus*. *Plant physiology*, Vol. 156, ed. 3, pp. 989-996.

Rocandio-Rodríguez, M., Santacruz-Varela, A., Córdova-Téllez, L., López-Sánchez, H., Castillo-González, F., Lobato-Ortiz, R., & Ortega-Paczka, R. (2014). *Caracterización morfológica y agronómica de siete razas de maíz de los Valles Altos de México*. *Revista fitotecnia mexicana*, Vol. 37, ed. 4, pp. 351-361.

Rzedowski, G., & de Rzedowski, C. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*.

Sánchez Ortega, I., & Pérez-Urria Carril, E. (2014). *Maíz I (Zea mays)*. REDUCA Biología, Vol. 7, ed. 2, pp. 151-171.

Schachtman, D. P., Reid, R. J., & Ayling, S. M. (1998). *Phosphorus uptake by plants: from soil to cell*. Plant physiology, Vol. 116, ed. 2, pp. 447-453.

Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press. Third Edition. USA.

Tapia-Torres, Y., & García-Oliva, F. (2013). *La disponibilidad del fósforo es producto de la actividad bacteriana en el suelo en ecosistemas oligotróficos: una revisión crítica*. Terra Latinoamericana, 31(3), 231-242.

Treseder, K. K., & Allen, M. F. (2002). *Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test*. New Phytologist, Vol. 155, ed. 3, pp. 507-515.

Thomson, B.D., Robson, A.D. & Abbott, L.K. (1992) *The effect of long-term applications of phosphorus fertilizer on populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pastures*. Aust J Agric Res, Vol. 43, pp.1131–1142.

Vessey, J. K. (2003). *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*. Plant and soil, Vol. 255, ed. 2, pp. 571-586.

Walker, T. W., & Syers, J. K. (1976). *The fate of phosphorus during pedogenesis*. Geoderma, Vol. 15, pp. 1-19.

Westgate, M. E., Edmeades, G. O., Bolanos, J., Elings, A., Ribaut, J. M., & Bänziger, M. (2000). The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. *Physiology and modeling kernel set in maize*, pp. 43-73.