



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

División de Estudios de Posgrado



**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas**

Área temática: Interacción Planta-Microorganismo-Insecto

**El papel de los Hongos Micorrízicos Arbusculares y  
microorganismos asociados en la salud de las raíces  
del maíz.**

**T E S I S**

Que como requisito para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Presenta:

**BIOL. MARCELA ESMERALDA SARABIA OCHOA**

Directores de tesis:

**DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD**

**DR. JOHN LARSEN**

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, MARZO DE 2012

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL **LABORATORIO DE AGROECOLOGÍA** DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA ASESORÍA DEL **DR. JOHN LARSEN** Y LA **DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD**, Y EN EL **INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS** DE LA UNIVERSIDAD DE AARHUS, DINAMARCA, BAJO LA ASESORÍA DE LA **DRA. SABINE RAVNSKOV**, CON EL APOYO DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO Y EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT).



## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Biología y al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Laboratorio Agroecología del Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco) de la Universidad Autónoma de México por las facilidades proporcionadas para realizar mi maestría

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para el desarrollo de esta investigación, tanto en México como durante mi estancia en Dinamarca, lo cual forma parte de mi formación profesional

Al Dr. Héctor Martínez Flores y Liliana Patricia Cerritos Barriga por la orientación y apoyo en los trámites y asuntos académicos relacionados con este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio de Agroecología, especialmente a Rocío Madrigal y Jacob Bañuelos, por su apoyo y compañerismo durante el desarrollo del trabajo realizado.

A Lezsek Karlinsky, por su apoyo inestimable y tiempo brindado al enseñarme la técnica de los ácidos grasos.

A Tina Tønnersen por su excelente ayuda técnica en la realización del análisis de ácidos grasos y por proveerme la cepa del patógeno utilizada en este trabajo.

A la Dra, Sabine Ravnskov todo mi agradecimiento por su amable hospitalidad y apoyo incondicional durante mi estancia en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Aarhus en Dinamarca, lo cual ayudó de manera extraordinaria a enriquecer y completar mi trabajo de investigación.

A los Doctores Angel Rebolgar y Miguel Martínez, por la revisión del escrito y sus sugerencias para mejorar el trabajo científico.

A la Dra. Sylvia Fernández –Pavía, por facilitarme las cepas de *Pythium* PV5 y PV8 probadas en esta investigación y por sus valiosas observaciones, sin las cuales esta tesis hubiera tenido más deficiencias de las que pueda tener.

A mi directora de tesis, la Dra. Yazmín Carreón Abud, por su invaluable respaldo y amistad, por haberme motivado a ingresar a la maestría, sin lo cual nada de esto hubiera sido posible, por su apoyo absoluto y sus importantes aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A mi director de tesis, Dr. John Larsen, por haber aceptado generosamente ser mi asesor, por su apoyo incondicional durante estos dos últimos años, por su dedicación, por haber compartido desinteresadamente sus amplios conocimientos que me nutrieron de manera fundamental para llevar a cabo este trabajo de investigación y por impulsarme a ser una mejor profesionista. Muchas gracias John, siempre te estaré agradecida por haberme enseñado acerca de la necesidad de la rigurosidad del pensamiento científico, del orden en el análisis y estudio y de la metodología en la investigación. Sobre todo ello, espero haber aprendido, por lo menos, algo al respecto.

*A mis padres Cuauhtémoc y Marcela,  
por su amor y apoyo incondicional.*

*A mi esposo Luis Roberto,  
gracias por haber sido mi fuente de inspiración  
en mi deseo de seguir preparándome.*

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	5
Rizósfera.....	5
Interacciones planta-suelo-microorganismo en la rizósfera.....	5
Interacciones entre microorganismos en la rizósfera .....	6
Control Biológico.....	7
Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) como agentes de control biológico....	7
Interacciones entre bacterias y HMA .....	8
Los ácidos grasos como mecanismo de estudio de las interacciones en la rizósfera.....	9
<i>Pythium</i> .....	10
Maíz .....	11
V. HIPÓTESIS .....	13
VI. OBJETIVO GENERAL.....	13
Objetivos particulares.....	13
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Suelo y Material Biológico.....	14
Diseño Experimental.....	14
FASE 1: Evaluación del efecto de diferentes inóculos de HMA en dos variedades de maíz .....	15

FASE 2: Desarrollo de un patosistema maíz/ <i>Pythium</i> .....	17
FASE 3: Evaluación del efecto de HMA en su fase pre-simbiótica contra <i>Pythium</i> en maíz.....	18
FASE 4: Evaluación del efecto de biocontrol de los microorganismos asociados a los HMA.....	19
Análisis Estadístico.....	21
VIII. RESULTADOS .....	22
FASE 1: Evaluación del efecto de diferentes inóculos de HMA en dos variedades de maíz .....	22
FASE 2: Desarrollo de un patosistema maíz/ <i>Pythium</i> .....	26
FASE 3: Evaluación del efecto de HMA en su fase pre-simbiótica contra <i>Pythium</i> en maíz.....	29
FASE 4: Evaluación del efecto de biocontrol de los microorganismos asociados a los HMA.....	31
Desempeño del crecimiento vegetal.....	31
Colonización radical con HMA.....	33
Biomarcadores de ácidos grasos.....	35
IX. DISCUSIÓN.....	41
Los HMA y su influencia en el desempeño vegetal.....	41
Efecto de <i>Pythium</i> en el desempeño vegetal.....	42
HMA como agente de control biológico.....	42
Interacción <i>Pythium</i> -HMA.....	44
Influencia de la interacción HMA- <i>Pythium</i> en los microorganismos en la rizósfera.....	44
X. CONCLUSIONES.....	46
XI. REFERENCIAS.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Valores de probabilidad ( <i>P</i> ) a partir del análisis de varianza del desempeño vegetal y la colonización de raíces, con diferentes tipos de inóculo de HMA como factor principal	<b>22</b>
<b>TABLA 2.</b> Valores de probabilidad ( <i>P</i> ) a partir del análisis de varianza del efecto de las cepas de <i>Pythium ultimum</i> como factor principal	<b>27</b>
<b>TABLA 3.</b> Valores de probabilidad ( <i>P</i> ) a partir del análisis de varianza del efecto de los HMA en la fase pre-simbiótica contra <i>P. ultimum</i>	<b>29</b>
<b>TABLA 4.</b> Valores de probabilidad ( <i>P</i> ) a partir del análisis de varianza de los parámetros medidos con <i>Pythium ultimum</i> , HMA y pesticidas como factores principales y sus interacciones	<b>31</b>
<b>TABLA 5.</b> Valores de probabilidad ( <i>P</i> ) a partir del análisis de varianza de los parámetros medidos con <i>Pythium ultimum</i> y HMA como factores principales y su interacción	<b>32</b>
<b>TABLA 6.</b> Valores de probabilidad ( <i>P</i> ) a partir del análisis de varianza de la colonización de raíces, con <i>Pythium ultimum</i> y HMA como factores principales y su interacción	<b>34</b>
<b>TABLA 7.</b> Promedios del porcentaje de colonización de HMA de las raíces inoculadas con los hongos micorrízicos <i>Glomus intraradices</i> , MTZUV y Población Nativa con y sin aplicación de los diferentes pesticidas	<b>34</b>
<b>TABLA 8.</b> Valores de probabilidad ( <i>P</i> ) a partir del análisis de varianza de los biomarcadores de ácidos grasos agrupados en los diferentes grupos de microorganismos como factores principales y su interacción	<b>36</b>

<b>TABLA 9.</b> Cantidad de biomarcadores de ácidos grasos específicos de los diferentes grupos de microorganismos en el suelo.	<b>37</b>
<b>TABLA 10.</b> Análisis de varianza de los biomarcadores de ácidos grasos de los diferentes grupos de microorganismos en tratamientos sin pesticidas	<b>39</b>
<b>TABLA 11.</b> Medias de los biomarcadores de ácidos grasos de los diferentes microorganismos en los tratamientos sin pesticidas	<b>39</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Proceso de la fase 1	<b>16</b>
<b>FIGURA 2.</b> Inoculación con <i>Pythium ultimum</i>	<b>20</b>
<b>FIGURA 3.</b> Colonización de raíces por HMA	<b>23</b>
<b>FIGURA 4.</b> Evaluación del efecto de diferentes tipos de inóculo de HMA	<b>24</b>
<b>FIGURA 5</b> Germinación de semillas y desempeño vegetal en los diferentes tratamientos con <i>Pythium</i> .	<b>26</b>
<b>FIGURA 6.</b> Evaluación del efecto de dos cepas de <i>Pythium</i>	<b>28</b>
<b>FIGURA 7.</b> Efecto de los diferentes tipos de inóculo de HMA en su etapa pre-simbiótica contra <i>Pythium</i>	<b>30</b>
<b>FIGURA 8.</b> Peso seco de la parte aérea de las plantas de maíz con o sin la inoculación de <i>P. ultimum</i> y con y sin inoculación de HMA	<b>32</b>
<b>FIGURA 9.</b> Peso seco de las raíces de las plantas de maíz con o sin la inoculación de <i>P. ultimum</i> y con y sin inoculación de HMA	<b>33</b>
<b>FIGURA 10.</b> Análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles de ácidos grasos microbianos obtenidos a partir del análisis conjunto de lípidos celulares de suelo con y sin <i>Pythium ultimum</i> y con y sin HMA, en tratamientos sin pesticidas	<b>40</b>

## I. RESUMEN

El principal método de manejo de enfermedades de los cultivos ha sido el control químico. El manejo biológico de las enfermedades causadas por patógenos con agentes de control biológico puede ser una alternativa al uso de pesticidas. En este estudio se evaluó el efecto de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) y sus bacterias asociadas en el control biológico de *Pythium ultimum* en plantas de maíz. Se llevaron a cabo 4 fases: 1) Evaluación del porcentaje de colonización de 6 inóculos de HMA en raíces de 2 variedades de maíz; 2) Desarrollo de un patosistema maíz/*P. ultimum*; 3) Evaluación del efecto de inóculos de HMA en su etapa presimbiótica contra *P. ultimum*; y 4) Evaluación del efecto de biocontrol de los microorganismos asociados a los HMA. Los resultados obtenidos en las tres primeras fases fueron utilizados para el establecimiento de la última fase. Así, en la fase 1 se probaron 6 diferentes tipos de inóculo de HMA en 2 variedades de maíz y fueron elegidos los 3 tipos de inóculo que mejor colonizaron las raíces y la variedad de maíz en donde el desempeño de las plantas fue mejor. Al desarrollar el patosistema (fase 2), elegimos la cepa de *Pythium ultimum* que ocasionó síntomas más claros de enfermedad en la planta. En la fase 3 fue posible observar que 2 de los inóculos probados tuvieron cierto efecto para mitigar los efectos del patógeno en las plantas de maíz. En la última etapa del experimento, fue posible observar que los HMA tuvieron un efecto de control biológico hacia el patógeno *P. ultimum*. Al realizar los estudios de biomarcadores de ácidos grasos fue posible observar que los microorganismos del suelo que se encuentran asociados a los HMA tuvieron un efecto indirecto contra el patógeno. Cambios en las comunidades microbiológicas del suelo en presencia de los HMA fueron observados. La presencia de *Pythium ultimum* también ocasionó modificaciones en la estructura de la comunidad microbiana.

## II. ABSTRACT

The principal method for controlling crop diseases has been through the use of chemicals. The management of diseases caused by pathogens with biological control agents can be an alternative to the pesticide use. This study assessed the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and their associated bacteria in the biological control of *Pythium ultimum* in plants of maize. 4 phases were carried out : 1) Evaluation of colonization percentage of 6 AMF inocula in roots of 2 varieties of maize; 2) Development of a pathosystem maize / *P. ultimum*; 3) Evaluation of the effect of AMF inocula in its pre-symbiotic stage against *P. ultimum*; and 4) Evaluation of the effect of biocontrol of the microorganisms associated with AMF. The results obtained in the first three phases were used to establish the final phase. In phase 1, 6 different types of AMF inoculum were tested in 2 varieties of maize, and were selected the 3 types of inoculum that best colonized the roots and the variety of maize which performance in plants was better. To develop the pathosystem (phase 2), we chose the strain of *Pythium ultimum* that resulted in more clear symptoms of disease in the plant. In the phase 3 it was possible to observe that 2 of the inoculants tested had certain effects to mitigate the effects of the pathogen in plants of maize. In the final stage of the experiment, it was possible to observe that the AMF had an effect of biological control toward the pathogen *P. ultimum*. In conducting studies of biomarkers of fatty acids was observed that the soil microorganisms that are associated with AMF had an indirect effect against the pathogen. Changes in soil microbial communities in the presence of AMF were observed. The presence of *Pythium ultimum* also caused changes in the microbial community structure.

### III. INTRODUCCIÓN

La utilidad de los sistemas agrícolas depende de la buena salud de las plantas. Los microorganismos fitopatógenos son componentes habituales de los ecosistemas naturales y agrícolas que pueden causar importantes pérdidas en el rendimiento de los cultivos como consecuencia de su ataque y el consiguiente desarrollo de enfermedades.

Los pesticidas han sido una opción para el manejo de fitopatógenos desde mediados del siglo pasado, ya que éstos resultan relativamente económicos y altamente efectivos. Su aplicación llegó a ser una práctica común como medida preventiva aún sin ningún ataque visible.

Sin embargo donde se han utilizado los pesticidas de manera indiscriminada, los fitopatógenos han desarrollado resistencia y se dificulta su control. (Altieri, 1999). Los pesticidas, además, tienen otros efectos negativos tanto en el ambiente como en la salud del hombre. Estos productos son causantes de la contaminación de cultivos, del agua utilizada para fines agrícolas y de los suelos destinados para las cosechas. Al ser arrastrados por las aguas causan la muerte de aves y peces, destruyendo su alimento. Por otro lado, también afectan la salud humana, ya que estos agentes químicos se acumulan en los alimentos que consumimos y representan un riesgo para las personas que los aplican ya que pueden provocarles daños en la salud. (Mullen *et al.*, 1997).

Esta situación ha obligado a los investigadores a desarrollar métodos de control alternativos para evitar el uso del control químico. Entre estas alternativas se encuentra el control biológico.

El control biológico consiste en el uso de microorganismos antagonistas que interfieren en la supervivencia de patógenos o en el desarrollo de actividades determinantes de enfermedad. En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos; es decir, el control biológico funciona naturalmente (Cook y Baker, 1983). Los microorganismos que crecen en la rizósfera son ideales como agentes de control biológico por presentar la primera línea de defensa de las raíces contra la infección por patógenos (Whipps, 2001). Entre estos microorganismos se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

Se ha demostrado que los HMA juegan un papel importante en la protección de plantas contra patógenos como hongos y nematodos (Whipps, 2004).

En el presente proyecto se pretende evaluar el efecto de los hongos micorrízicos arbusculares y sus microorganismos asociados en el control biológico de plantas de maíz.

### III. MARCO TEÓRICO

#### **Rizósfera**

La rizósfera es la zona del suelo que se encuentra alrededor de las raíces. La actividad de éstas tiene un impacto en las condiciones fisicoquímicas y en la actividad biológica de la rizósfera, y viceversa. La estrecha relación que existe entre las plantas y su entorno es esencial para la adquisición de agua y nutrientes así como las interacciones con los microorganismos del suelo (Ryan *et al.*, 2009).

Los microorganismos son un componente vital de la rizósfera y la biomasa total así como la composición de las poblaciones microbianas afectan marcadamente las interacciones entre plantas y el ambiente del suelo. Hay un interés considerable en el desarrollo de métodos para promover la proliferación de las poblaciones introducidas benéficas o microbianas indígenas que facilitan la absorción de nutrientes (por ejemplo, rizobios y micorrizas) que promueven el crecimiento de la planta directamente, o controlan los patógenos de las plantas.

Los microorganismos pueden relacionarse entre sí, dando lugar, en muchos casos a interacciones sinérgicas que favorecen la nutrición de la planta e incrementan su producción (Lambers *et al.*, 2009).

#### **Interacciones planta-suelo-microorganismo en la rizósfera**

Las plantas y sus microorganismos asociados desempeñan un papel crucial en la formación o la modificación del suelo. Los microorganismos interactúan con los productos de las raíces de las plantas en una variedad de formas positivas, negativas y neutras (Raaijmakers, 2009).

Muchos de los microbios que tienen un efecto neutral sobre la planta, forman parte de la compleja red alimentaria que utiliza una gran cantidad de carbono que es fijado por la planta y liberado en la rizósfera.

Entre los microorganismos que afectan negativamente el crecimiento vegetal y la salud de las plantas se encuentran los hongos patógenos, oomicetos, bacterias y nematodos, mientras que entre los microorganismos que son beneficiosos se incluyen las bacterias fijadoras de nitrógeno, los hongos endo y ectomicorrízicos y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

(Johansson *et al.*, 2004).

Los microorganismos en la rizósfera que influyen beneficiosamente en las plantas tienen diversos modos de acción como son: la estimulación del crecimiento en la planta, la mineralización de la materia orgánica; la solubilización de minerales; reacciones de quelación; la absorción y translocación de nutrientes; la fijación biológica de nitrógeno; la degradación de xenobióticos y la producción de fitohormonas, enzimas, vitaminas y antibióticos. Las plantas también tienen efectos sobre los microorganismos. La liberación de compuestos orgánicos por parte de las raíces tiene gran influencia sobre la disponibilidad de nutrientes y en consecuencia sobre la actividad microbiana. Además de sustrato para las bacterias, estos compuestos tienen la capacidad de quelar cationes y formar agregados del suelo, definiendo su estructura (Bowen y Rovira, 1991).

El crecimiento microbiano está limitado por la disponibilidad de carbono orgánico, su aporte por los exudados radicales y las bajas concentraciones de O<sub>2</sub> favorecen la actividad y el crecimiento de las bacterias. Las raíces en crecimiento son una fuente vital de carbono para la biomasa microbiana (Buée, 2009). Como resultado de todo ello, la rizosfera es rica en microorganismos.

### **Interacciones entre microorganismos en la rizósfera**

Los microorganismos pueden interactuar sinérgicamente degradando moléculas complejas lo cual es realizado por poblaciones mixtas de microbios de tal suerte que una población le ofrece a otra un sustrato más simple (Johansson *et al.*, 2004)

En el suelo también existen interacciones antagónicas que se pueden llevar a cabo entre los diferentes tipos de microorganismos (bacterias, hongos y protozoarios, entre otros), por ejemplo: 1) la competencia por factores limitantes como son el C, N, P y el Fe; competencia por los sitios de la colonización y los nutrientes suministrados por semillas y raíces; 2) la producción de sustancias inhibitoras o tóxicas produciendo efectos microbicidas; 3) el parasitismo que puede implicar la producción de enzimas extracelulares; y 4) la predación en donde las bacterias son las más expuestas por protozoarios, hongos y algas (Whipps, 2001).

Las interacciones microbianas en la rizósfera son en su mayoría vistas desde la perspectiva de cómo los microorganismos beneficiosos inhiben el crecimiento o la actividad de los microorganismos patógenos. Sin embargo, también los patógenos tienen una diversa gama de mecanismos para contrarrestar el antagonismo, incluyendo la expulsión activa y la degradación de compuestos antimicrobianos, y la interferencia con la regulación y la biosíntesis de enzimas y metabolitos antimicrobianos producidos por microorganismos antagónicos (Raaijmakers, 2009).

### **Control Biológico**

El control biológico considera el uso de productos naturales para promover el crecimiento de las plantas por la estimulación de respuestas de defensa a estrés de origen abiótico o biótico (Alabouvette *et al.*, 2009). Los microorganismos que crecen en la rizósfera son ideales como agentes de control biológico por presentar la primera línea de defensa de las raíces contra la infección por patógenos (Weller, 1988).

Los microbios que más contribuyen al control de enfermedades de las plantas son aquellos clasificados como saprófitos competitivos, los hiperparásitos facultativos y los simbioses de plantas.

Generalmente, los organismos antagonistas presentan más de un modo de acción. Varios de estos mecanismos han sido descritos en muchos estudios. Entre éstos se encuentran el micoparasitismo, la lisis enzimática, la antibiosis, la competencia por espacio o por nutrientes, y la inducción de resistencia en la planta (Whipps, 2001). La multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. El uso de combinaciones de antagonistas de diferente modo de acción, reduce los riesgos de resistencia por parte de los patógenos.

Entre los agentes de control biológico se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares y las bacterias.

### **Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) como agentes de control biológico**

El papel que los HMA ejercen confiriendo una mayor resistencia y tolerancia a

las plantas frente al ataque de patógenos que causan enfermedades a las plantas, ha despertado un elevado interés en los últimos tiempos.

Se ha comprobado a través de varios cultivos que los HMA han tenido un efecto exitoso en el control de hongos, bacterias y nematodos. Varias especies de HMA son capaces de suprimir el ataque del Damping off o marchitamiento fúngico provocado por especies de *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* (Alarcón *et al.*, 2004).

Varios mecanismos para explicar el control biológico por medio de los HMA han sido propuestos, como los cambios en el estatus de nutrimentos, la inducción de resistencia, cambios bioquímicos en los tejidos de la planta, cambios anatómicos en las células, alivio de estrés, cambios en la morfología del sistema radical, competencia entre HMA y patógenos por espacio y nutrimentos y bacterias asociadas con HMA con efectos de biocontrol (Whipps, 2004). Sin embargo, es difícil generalizar los efectos bioprotectores de estos hongos, ya que estos dependen en gran medida de la especie vegetal implicada, del aislado de los HMA, del patógeno y su nivel de virulencia y las condiciones medioambientales (Azcón –Aguilar y Barea, 1996).

En general se ha descrito que los HMA reducen los daños de la enfermedad producida por los patógenos que infectan el sistema radical (Slezack *et al.*, 2000).

Los hongos micorrízicos arbusculares constituyen un insumo microbiológico promisorio para el desarrollo de una agricultura sostenible; su papel en el funcionamiento de los ecosistemas y su potencial como fertilizantes biológicos, son quizás motivos suficientes para considerarlos como uno de los componentes importantes en la agroecología moderna (Guerra, 2008).

### **Interacciones entre bacterias y HMA**

En diversos estudios se ha encontrado que los HMA se encuentran asociados con ciertas bacterias las cuales pueden vivir con el hongo como entidades intracelulares (endobacterias) o como colonizadores externos de sus esporas (Bianciotto *et al.*, 1996).

Existen reportes que indican que las bacterias asociadas con los HMA pueden mejorar la estructura del suelo o trabajar antagonicamente frente a hongos

fitopatógenos (Bethlenfalvay *et al.*, 1997; Budi *et al.*, 1999; Xavier y Germida, 2003).

Se ha encontrado en algunos estudios realizados que la ausencia de bacterias afecta severamente el crecimiento presimbótico de los HMA tales como la elongación hifal y la ramificación, lo que indica que las endobacterias son importantes para un óptimo desarrollo de su hospedero fúngico (Bonfante y Anca, 2009).

Los HMA y las bacterias actúan sinérgicamente estimulando el crecimiento de las plantas a través de mecanismos que incluyen una mejor adquisición de nutrientes, incrementando la disponibilidad del fosfato y la inhibición de patógenos fúngicos (Morgan *et al.*, 2005).

Se ha demostrado a partir de varios estudios que los HMA pueden reducir la incidencia de enfermedades de la raíz causada por *Pythium* (Larsen *et al.*, 2003). Se ha sugerido el antagonismo de las bacterias en el micorrizósfera como un posible mecanismo (Budi *et al.*, 1999).

Estas interacciones pueden ser cruciales dentro de la agricultura sostenible que dependen de los procesos biológicos y que pueden ser usados como alternativas al uso de agroquímicos para mantener la fertilidad del suelo y la salud de las plantas.

### **Los ácidos grasos cómo mecanismo de estudio de las interacciones en la rizósfera**

Los métodos basados en el uso de biomarcadores de ácidos grasos han sido empleados en muchas áreas de la microbiología del suelo ya que a través de ellos es posible la identificación de microorganismos específicos, el análisis de la comunidad microbiana y estimaciones de la biomasa (Frostegard and Baath, 1996; Larsen *et al.*, 2000) además de que pueden ser utilizados para el análisis de las cadenas alimenticias (Ruess, *et al.*, 2005).

Debido a que los biomarcadores de ácidos grasos proporcionan información cualitativa y cuantitativa de las comunidades microbianas, éstos han sido muy utilizados en el estudio de las interacciones planta- suelo-microorganismo. Los fosfolípidos de ácidos grasos (PLFAs) pueden ser utilizados para estimar la biomasa de los microorganismos y los ácidos grasos de lípidos neutros (NLFAs) para la estimación de las reservas energéticas de hongos. Los análisis

de ácidos grasos de células completas (WCFA) han demostrado ser relativamente rápidos y fiables como un método de estudio de la microbiología del suelo y de las plantas (Larsen *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2009).

La limitada especificidad de los ácidos grasos microbianos no permite una cuantificación de microorganismos específicos, excepto cuando la cuantificación de ciertos microorganismos es en el interior de la planta, como sucede con los HMA que viven en las raíces de éstas (Olsson, 1999) y en este caso pueden ser cuantificados con el biomarcador de ácidos grasos 16:1 $\omega$  5.

### ***Pythium***

El género *Pythium* pertenece a la familia Pythiaceae, orden Pythiales, clase Oomycetes, phylum Oomycota, y reino Stramenipila (Kirk *et al.*, 2008). El género está ampliamente distribuido a través del mundo, y aproximadamente 150 especies han sido descritas (Kirk *et al.*, 2008). Los miembros de este phylum ocupan mucho nichos ecológicos (Paul *et al.*, 2006)

El grupo de los oomicetes engloba especies tanto saprófitas como parásitas. Presentan una gran importancia económica puesto que engloban parásitos de plantas vasculares, muchas de ellas de interés agrícola.

*Pythium* es el género más prevalente de este phylum, y sus especies individuales abarcan un mayor número de hospederos. Algunas especies son micoparásitas (como *P. oligandrum*) es decir, que parasitan a otros oomicetes y hongos, y han sido utilizados como agentes de control biológico.

Muchas especies de *Pythium*, junto con sus parientes cercanos, *Phytophthora*, son patógenos de plantas de importancia económica en la agricultura. *Pythium* ocasiona la podredumbre común de las raíces de las plántulas. Esta es una enfermedad muy común en el campo y los invernaderos, donde el organismo mata a las plantas en los semilleros recién plantados (Agrios, 2010). Esta enfermedad por lo general implica relaciones complejas con otros hongos como *Phytophthora* y *Rhizoctonia*.

Estas enfermedades pueden afectar esquejes, plantas, y todas las etapas de los cultivos. *Pythium*, es la causa del ahogamiento de las plántulas, la pudrición de la semilla, raíz y frutos carnosos, además de otros órganos que se encuentran en contacto con el suelo (Agrios, 1996). Cuando una planta es atacada por *Pythium*, las hifas penetran los tejidos por medio de celulasas, y

una vez que logran colonizar el tejido, forman estructuras reproductivas para generar oosporas. Las oosporas se consideran estructuras de resistencia, que le permiten sobrevivir en el suelo hasta volver a infectar una nueva planta. Se ha reportado que la presencia de fitoesteroles promueve el desarrollo de oosporas (Ayers y Lumsden, 1975) por lo que son empleados para el aislamiento y cultivo de este hongo en laboratorio. Las oosporas son el producto sexual de la fusión de un oogonio y uno o varios anteridios. La reproducción de la mayoría de las especies de *Pythium* es homotática, es decir que no se requiere otro organismo para poder producir estructuras reproductivas, sin embargo, también se han encontrado casos de reproducción heterotática (Ko, 1998).

Las infecciones por *Pythium* spp. son más graves cuando los suelos están mal aireados o hay saturación de agua.

Las distintas especies de *Pythium* tienden a ser muy inespecíficos y generalistas en su gama de hospederos. Cada especie puede infectar a una amplia gama de hospederos (Owen-Going, 2002).

Sin embargo, los daños ocasionados por *Pythium* se limitan a un área de los cultivos. Esto se debe a la poca movilidad de las zoosporas, que necesitan una superficie de agua para trasladarse y a la capilaridad de las partículas del suelo, que tienden a actuar como un filtro natural. La podredumbre de las raíces afecta a todo el cultivo (decenas de miles de plantas, en muchos casos) en un plazo de dos a cuatro días (Owen-Going *et al.*, 2003).

Algunas prácticas comunes para prevenir infecciones en cultivos por *Pythium* incluyen: la rotación de cultivos, el tratamiento de semillas con fungicidas y el evitar el exceso de humedad en el suelo.

Sin embargo, varias especies de *Pythium*, incluyendo *P. oligandrum*, *P. nunn*, *P. peripoculum* y *P. acanthicum* son micoparásitos de hongos y oomycetes parásitos, por lo que han recibido gran atención como agentes de control biológico.

## **Maíz**

El maíz (*Zea mays*) es una gramínea anual originaria de América y representa uno de los cereales de mayor importancia para la alimentación de la población latinoamericana.

Actualmente es el cereal más plantado en el mundo en volumen de producción, superando al trigo y al arroz. En México es el cultivo más importante y la principal fuente de alimento. La producción anual del maíz en nuestro país es de 18.2 millones de toneladas en una superficie de 8.5 millones de hectáreas (Rosa *et al.*, 2006).

México posee la mayor diversidad genética de maíz, la cual se manifiesta en variación de caracteres morfológicos vegetativos, así como de espiga, mazorca y grano, y en la composición química del grano, de las 436 razas reportadas en el continente americano, 50 se encuentran en México (Rosa *et al.*, 2006)

La mayor diversidad de razas, y variedades del maíz que se concentran en México, han formado parte del germoplasma con el que se han desarrollado variedades de alto rendimiento y adaptabilidad, así como la producción de híbridos para zonas de riego (Sánchez y Goodman, 1992).

La mayor parte de la producción de grano proveniente de híbridos, se destina principalmente a la industria, mientras que el grano proveniente de las variedades criollas se destina principalmente al autoconsumo (Salazar *et al.*, 2009).

El maíz puede ser atacado por numerosas plagas y enfermedades ocasionadas por bacterias, hongos, virus y malezas. Todas las partes de la planta del maíz son susceptibles a enfermedades que reducen la capacidad de la planta para crecer de una manera normal, lo cual puede producir pérdidas considerables en la producción de este cereal.

En la actualidad las enfermedades del maíz son controladas mediante prácticas culturales, el uso de productos químicos y el empleo de plantas con resistencia genética (White, 2004).

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares y las bacterias asociadas a ellos, tienen un efecto de control biológico contra *Pythium* en plantas de maíz.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de los Hongos Micorrízicos Arbusculares y las bacterias asociadas en la salud de las raíces del maíz.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Evaluar el efecto de los HMA en el control biológico contra *Pythium* en plantas de maíz.
2. Examinar el efecto que tienen los microorganismos asociados a los HMA en el papel de control biológico de la planta de maíz.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### Suelo y Material Biológico

El suelo utilizado en los experimentos fue extraído del campo de maíz del Centro Regional Universitario de Centro Occidente (CRUCO) de la ciudad de Morelia Michoacán.

Se llevó a cabo una mezcla del suelo con arena en proporción 1:1 y se esterilizó en autoclave por 1 hr a 120°C y 15 libras de presión.

En estos experimentos se utilizó el siguiente material biológico:

- Dos variedades de maíz (*zea mays*): NB9 (resistente a sequía) y NB10.
- *Pythium ultimum*
- Seis diferentes inóculos de HMA

### Diseño Experimental

El experimento constó de cuatro fases, las cuales fueron realizadas en el laboratorio de agroecología del Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco), UNAM Campus Morelia.

## **FASE 1: Evaluación del efecto de diferentes inóculos de HMA en dos variedades de maíz.**

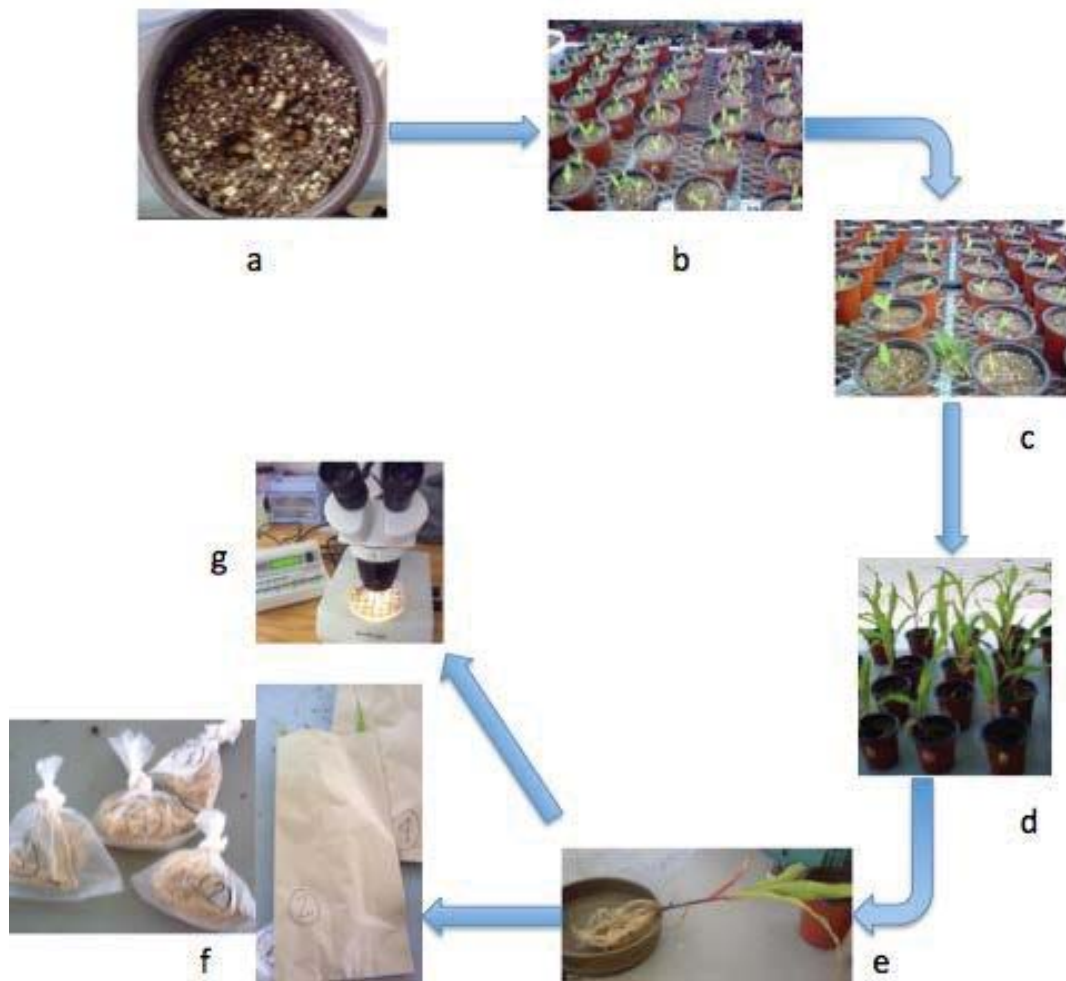
La fase incluyó dos factores combinados en 12 tratamientos en un diseño factorial completo como se muestra a continuación:

Factor	Niveles
Hongos Micorrízicos Arbusculares	- 1 Población nativa
	- 3 Inóculos de laboratorio
	- 1 Inóculo comercial
	- 1 testigo
Variedades de maíz	- NB9
	- NB10

Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se mezclaron 400 g de arena con 350 g de suelo en cada maceta. La inoculación se llevó a cabo en el momento de la siembra mezclando el suelo-arena con 50 g del inóculo correspondiente. Se añadieron 240 ml de agua a cada maceta antes de la siembra de semillas. Se sembraron tres semillas en cada maceta de los diferentes tratamientos. Las plantas se cosecharon después de cuatro semanas. La parte aérea y las raíces fueron secadas en la estufa por 48 hrs.

Para determinar el porcentaje de colonización por parte de los inóculos de los HMA en las raíces, 2 gramos de raíces por tratamiento fueron aclaradas y teñidas bajo la técnica de Phillips y Hayman (1970). Las raíces teñidas fueron analizadas bajo el método línea-intercepto descrito por Giovanetti y Mosse (1980).

La parte aérea y las raíces fueron secadas en la estufa por 48 hrs. El peso seco de la de la planta se tomó en cuenta como una variable a evaluar.



**Figura 1.** Proceso de la fase 1: a) siembra de semillas; b) germinación después de 5 días; c) después de 2 semanas se dejó solo una plántula; d) plantas después de cuatro semanas; e) cosecha y lavado de raíces; f) tanto la parte aérea como las raíces fueron secadas en estufa por 48 hrs.; g) 2g de raíces frescas fueron aclaradas y teñidas bajo la técnica de Philips y Hayman (1970) para su posterior observación y conteo de porcentaje de colonización.

## **FASE 2: Desarrollo de un patosistema maíz/*Pythium*.**

El objetivo de esta fase consistió en desarrollar un patosistema con cepas de *Pythium* en plantas de maíz para elegir la cepa de *Pythium* con el grado infectividad más conveniente.

El diseño experimental consistió en tres tratamientos en un diseño factorial completo: dos cepas de *Pythium* (PV8 y HB2) y un testigo (sin *Pythium*). Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones, dando un total de 12 unidades experimentales.

Semillas de maíz (híbrido NB9) fueron utilizadas como planta hospedera. Tres semillas fueron sembradas en una mezcla de suelo y arena en una proporción 1:1 en los tubos Falcon. Los tubos fueron regados cada 2 días a un 90% de su capacidad de campo.

Las cepas de *Pythium* PV8 fueron proporcionadas por la Dra. Sylvia Fernández-Pavía del laboratorio de patología vegetal, IIAF de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y la cepa HB2 por el departamento de manejo integrado de plagas, de la Universidad de Aarhus, Dinamarca.

Las cepas de *Pythium* fueron tomadas de un cultivo de agar papa dextrosa y fue cortado en pequeños trozos de aproximadamente 1cm x 1 cm y transferidos a los tubos Falcon junto a las semillas de maíz y cubiertas por la mezcla de suelo.

La cosecha se llevó a cabo después de 25 días. Las raíces y parte aérea de las plantas fueron medidas y pesadas. Las raíces de las plantas fueron examinadas para la detección de síntomas de pudrición (decoloración).

### **FASE 3: Evaluación del efecto del HMA en su fase presimbiótica contra *Pythium* en maíz.**

Al igual que en la fase 2, en esta etapa se decidió utilizar tubos Falcon como unidades experimentales con la finalidad de mitigar el riesgo de que las plantas no crecieran con las bajas temperaturas.

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de diferentes inóculos de HMA en su fase presimbiótica para el control biológico de *Pythium* en plantas de maíz.

El experimento tuvo un diseño con dos factores combinados en 12 tratamientos en un diseño factorial completo: seis inóculos diferentes de HMA, una cepa de *Pythium* y un testigo (sin *Pythium*) con 4 repeticiones, dando un total de 48 unidades experimentales.

Al igual que en la fase 2, tres semillas de maíz (híbrido NB9) fueron sembradas en una mezcla de suelo y arena en una proporción 1:1 en los tubos Falcon. 40.5 gramos de la mezcla suelo-arena fueron revueltos con 4.5 gramos de inóculo para cada tratamiento. Los tubos fueron regados cada 2 días a un 90% de su capacidad de campo.

El inóculo HB2 de la Universidad de Aarhus, Dinamarca, fue tomado de un cultivo de agar papa dextrosa y fue cortado en pequeños tablas de aproximadamente 1cm x 1 cm y transferidos a los tubos Falcon junto a las semillas de maíz y cubiertas por la mezcla de suelo.

La cosecha de plantas se llevó después de 15 días. Las raíces y parte aérea de las plantas fueron medidas y pesadas. Las raíces de las plantas fueron examinadas para la detección de síntomas de pudrición (decoloración).

#### **FASE 4. Evaluación del efecto de biocontrol de los microorganismos asociados a los HMA.**

El objetivo de esta fase fue examinar el efecto que tienen los microorganismos asociados a los HMA en el papel de control biológico de la planta de maíz. Esta fase consistió en tres factores combinados:

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>
Hongos Micorrízicos Arbusculares	- 1 población nativa - 2 inóculos de laboratorio - 1 Testigo
<i>Pythium ultimum</i>	- HB2 - Testigo
Pesticidas	- Agromicina (100mg/g) - Benomil 100 µg/g (Larsen <i>et al.</i> 1996) - Agromicina + Benomil - Testigo

Dando un total de 32 tratamientos con cuatro repeticiones.

Al igual que en la fase 1, se mezclaron 400 g de arena con 350 g de suelo en cada maceta. La inoculación con HMA se llevó a cabo en el momento de la siembra mezclando el suelo-arena con 50 g del inóculo correspondiente. Se añadieron 240 ml de agua a cada maceta antes de la siembra de semillas. Se sembraron tres semillas en cada maceta de los diferentes tratamientos.

Después de una semana de la siembra se aplicó la primer dosis del fungicida Benomil (Larsen *et al.* 1996).

La inoculación de las plantas con *P. ultimum* (HB2) se llevó a cabo después de tres semanas de la siembra de las semillas, para garantizar que la colonización de los HMA en las raíces se haya llevado a cabo. Un día antes de la inoculación se aplicó el antibiótico Agromicina.

Para este paso, la cepa de HB2 fue transferido de un medio de cultivo de harina de maíz a rebanadas de pepino estériles y éstas fueron incubadas por 24 hrs. (Fig. 2a y 2b). Las rebanadas de pepino con los inóculos de *Pythium* se colocaron dentro de las macetas (Fig. 2c).

Una segunda dosis de Benomil fue aplicada en las macetas a las 4 semanas de su siembra



a



b



c

**Figura 2.** a) Rebanadas de pepino estéril. b) Las rebanadas de pepino con el patógeno después de ser incubados por 24 hrs. c) Inoculación del patógeno en las macetas.

La cosecha se llevó a cabo después de 3 semanas de la inoculación con *Pythium*. La planta completa fue retirada de su maceta y el suelo se homogeneizó en un recipiente grande, tomando muestras de 10 g para el análisis de ácidos grasos.

Las raíces fueron lavadas, pesadas y se tomó una muestra de éstas de 2g para determinar el porcentaje de colonización de HMA bajo la técnica de Giovanetti

y Mosse (1980). El resto de la raíz y la parte aérea fueran secadas en la estufa por 48 horas y posteriormente pesadas.

Las muestras de suelo que fueron utilizadas para la técnica de ácidos grasos totales fueron liofilizadas.

La extracción, análisis cromatográfico e identificación de los biomarcadores de ácidos grasos totales, se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Agrícolas, de la Universidad de Aarhus, Dinamarca, bajo la asesoría de la Dra. Sabine Ravnskove, siguiendo la técnica de Sasson, 1990. Los análisis de la cromatografía de gases y la identificación de ácidos grasos se realizaron de acuerdo a la base de datos TSBA 41 (Parsley, 1996).

### **Análisis Estadístico**

Todos los datos fueron analizados usando un Análisis de Varianza Multifactorial. Cuando las diferencias son significativas se realizarán comparaciones mediante la prueba de DMS.

Para el análisis cualitativo se efectuará una Análisis de Componentes Principales (PCA) para los perfiles microbianos.

## VII. RESULTADOS

### FASE 1: Evaluación del efecto de diferentes inóculos de HMA en dos variedades de maíz.

Después de cuatro semanas las plantas fueron cosechadas. Al observar los tratamientos de las dos variedades de maíz, fue evidente que las plantas de maíz NB9 eran más grandes que las de la variedad NB10.

El análisis de varianza para el peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y colonización se puede resumir como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Valores de probabilidad (P) a partir del análisis de varianza del desempeño vegetal y la colonización de raíces, con diferentes tipos de inóculo de HMA como factor principal. Donde: \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001

	ANÁLISIS DE VARIANZA		Valores de P		
	Peso seco parte aérea	Peso seco raíz	HMA	<i>Pythium</i>	Otros
<b>HMA</b>	***	*	***	***	***
<b>Variedad de maíz</b>	***	0.14	0.37	0.54	0.38
<b>A*B</b>	0.36	0.58	0.31	0.38	0.56

En cuanto al peso seco en la parte aérea, hubo una diferencia altamente significativa entre los inóculos de HMA y entre las dos variedades de maíz. El inóculo comercial fue el que tuvo el menor peso seco promedio, siendo significativamente diferente de los demás, mientras que el inóculo 28A (*Glomus intraradices*) fue el que tuvo el peso más elevado (Figura 4a). Respecto a las variedades de maíz evaluadas, el peso seco de la parte aérea fue reducida en los tratamientos con NB10 en comparación con los tratamientos de NB9. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 1, no hubo interacción significativa entre los dos factores evaluados (inóculos HMA y variedades de maíz), lo que sugiere que el comportamiento de los inóculos en ambas variedades de maíz fue igual.

En el peso seco de las raíces hubo diferencia entre los inóculos probados, siendo el inóculo comercial el de menor peso (Figura 4b). No hubo diferencias significativas entre las dos variedades de maíz y no hubo interacción alguna entre los factores evaluados.

Con relación a la colonización de HMA, existen diferencias significativas entre los inóculos que se evaluaron (Figura 4c), siendo el inóculo comercial el que presentó una mayor colonización con respecto a los demás. El inóculo 28A (*Glomus intraradices*).

fue el inóculo con menor colonización de HMA. En todos los tratamientos se pudieron observar vesículas, hifas y en algunos casos arbúsculos (Figura 3).

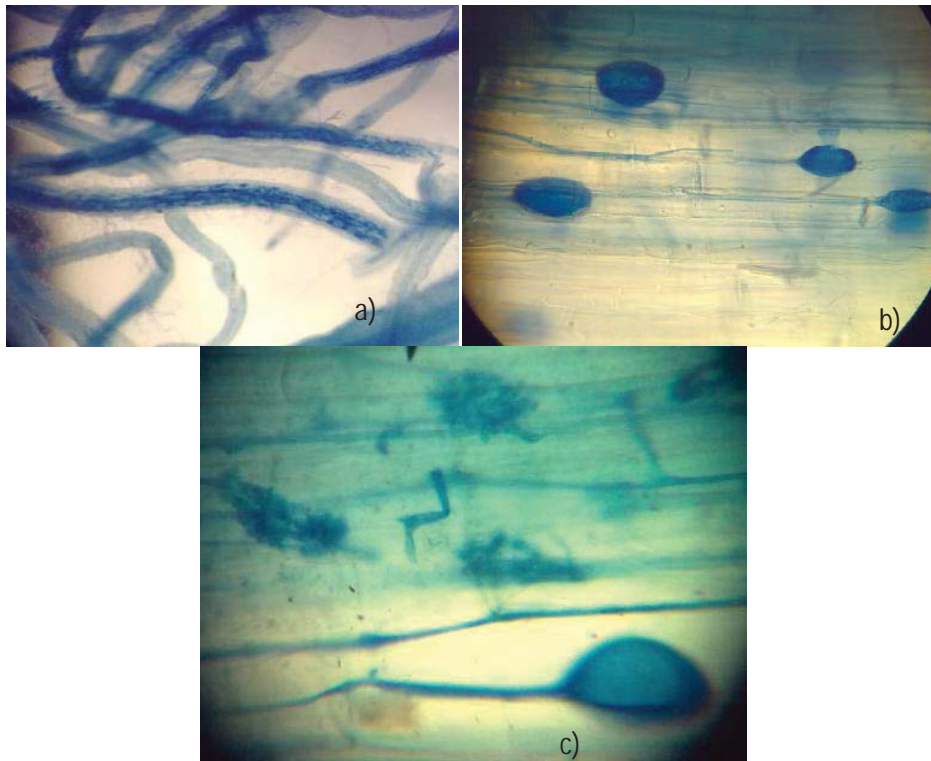
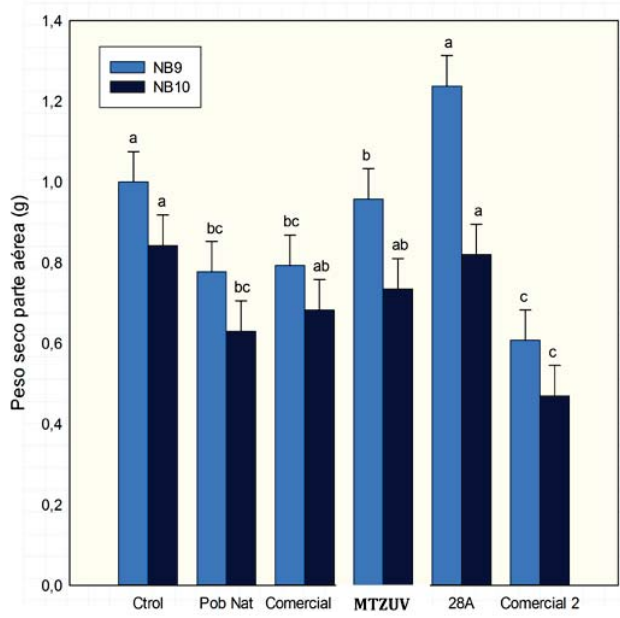
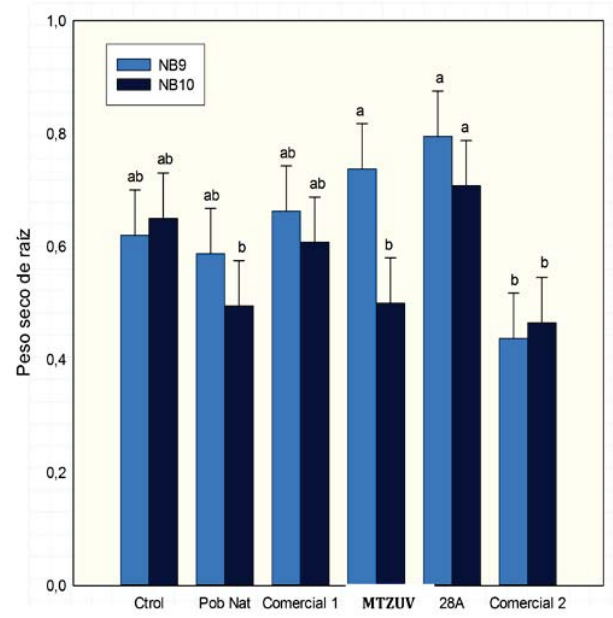


Figura 3. Colonización de raíces por HMA. a) raíces colonizadas; b) vesículas; c) arbúsculos

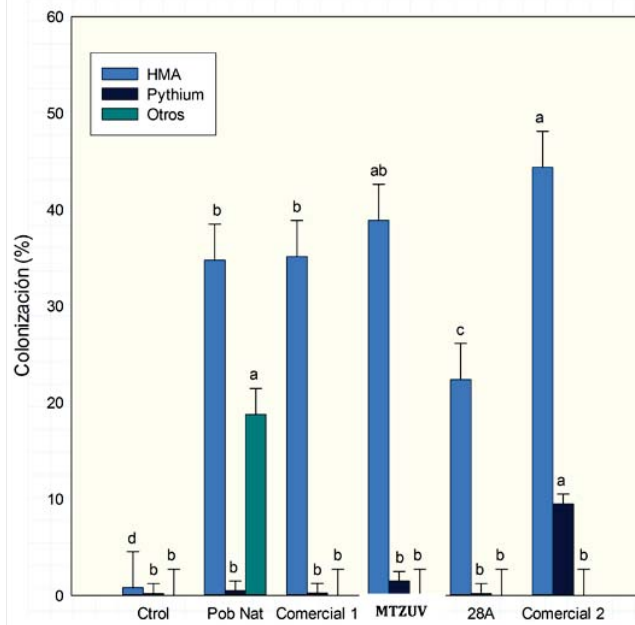
Al hacer el análisis de colonización se observó que algunos inóculos tenían otro tipo de microorganismos, entre los cuales se pudo visualizar la presencia de *Pythium* en el inóculo comercial. En la población nativa, se observaron estructuras de otros hongos diferentes a los HMA (Figura 4c).



a)



b)



c)

Figura 4. Evaluación del efecto de diferentes tipos de inóculo de HMA. a) Peso seco parte aérea; b) Peso seco raíz; c) Colonización

Después de evaluar los diferentes inóculos de HMA en las dos variedades de maíz se decidió que los inóculos que serían utilizados en la fase 4 eran: población nativa, *Glomus intraradices* (28A) y MTZUV.

A pesar de que el inóculo comercial 2 tuvo el mayor porcentaje de colonización con respecto a los otros inóculos, éste presentó contaminación con *Pythium*, razón por la cual lo descartamos.

La población nativa tuvo presencia de otros hongos, sin embargo este tipo de inóculo sí fue elegido para la fase 4 pues representa al conjunto de microorganismos que viven en condiciones naturales en el suelo.

La variedad de maíz que decidimos utilizar en la fase 4 fue la NB9, ya que las plantas de esta variedad tuvieron un mayor crecimiento en general que las de la variedad NB10.

## FASE 2: Desarrollo del patosistema maíz/*Pythium*.

Las plantas fueron cosechadas 25 días después de su siembra. No se observaron síntomas severos de enfermedad en las raíces, aunque éstas fueron más delgadas y frágiles en las plantas con los tratamientos que contenían HB2.

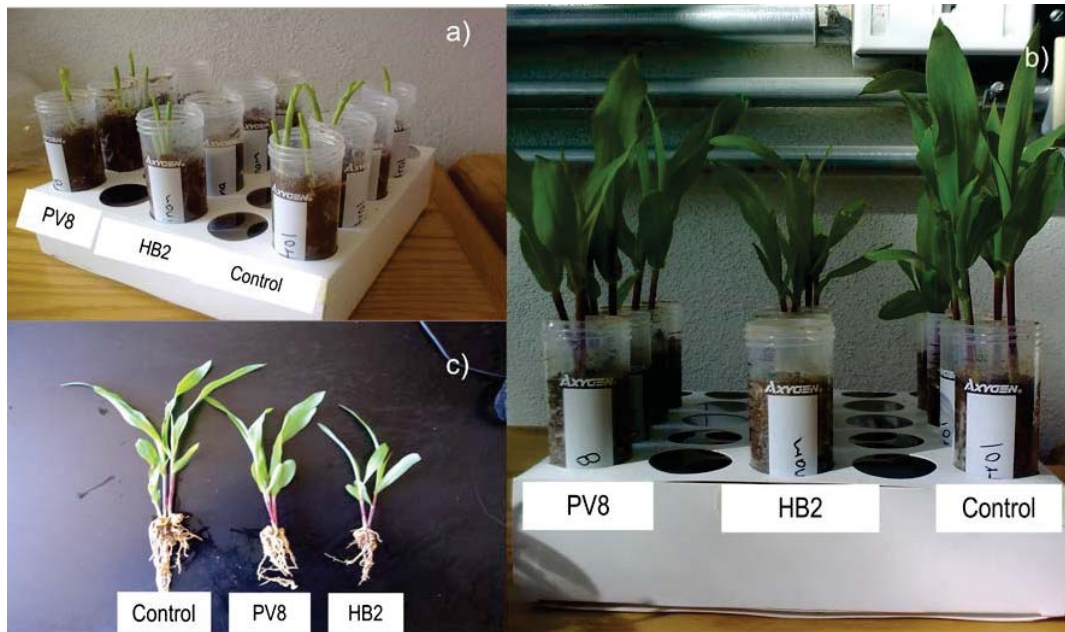


Figura 5. Germinación de semillas en los diferentes tratamientos con *Pythium*. a) Plantas germinadas; b) Plantas a los 25 días; c) Plantas cosechadas.

La germinación en los tratamientos que contenían la cepa de HB2 fue menor que los tratamientos que fueron inoculados con PV8 (Figura 5a). Sin embargo al hacer el análisis de varianza no existió una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (Tabla 2).

La longitud de las raíces de las plantas no mostraron diferencias significativas en los tratamientos evaluados (Tabla 2) (Fig 6e).

En cuanto a los pesos de las raíces, de las hojas y de las plantas completas, los tratamientos que contenían las cepas PV8 y HB2 tuvieron un efecto sobre las plantas al tener un peso significativamente diferente con respecto al control (Tabla 2), sin embargo entre ellos no hubo una diferencia significativa, a pesar

de que los tratamientos con la cepa HB2 tuvieron un peso menor que los que contenían a la cepa PV8 (Figs 6b, 6c y 6d). Esto mismo ocurrió al evaluar la longitud de las hojas (Tabla 2) (Fig 6f).

Tabla 2. Valores de probabilidad (P) a partir del análisis de varianza del efecto de las cepas de *Pythium ultimum* como factor principal.

Donde: \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001

**ANALISIS DE VARIANZA    Valores de P**

	<b>Peso planta</b>	<b>Peso raíz</b>	<b>Peso hoja</b>	<b>Longitud de hoja</b>	<b>Longitud Raíz</b>	<b>Semillas germinadas</b>
<b><i>Pythium</i></b>	*	***	*	**	0.075	0.5063

Las dos cepas de *Pythium* evaluadas en este experimento tuvieron un efecto en las plantas. A pesar de no haber síntomas como la decoloración en las raíces (quizá por el poco tiempo que duró el experimento), sí se encontró una disminución en su peso y el crecimiento general de la planta.

En ninguna de las variables evaluadas se encontró una diferencia significativa entre las dos cepas de *Pythium* sin embargo para los demás experimentos de las fases restantes, decidimos elegir la cepa *HB2* debido a que parece ser un poco más infectiva que la cepa PV8.

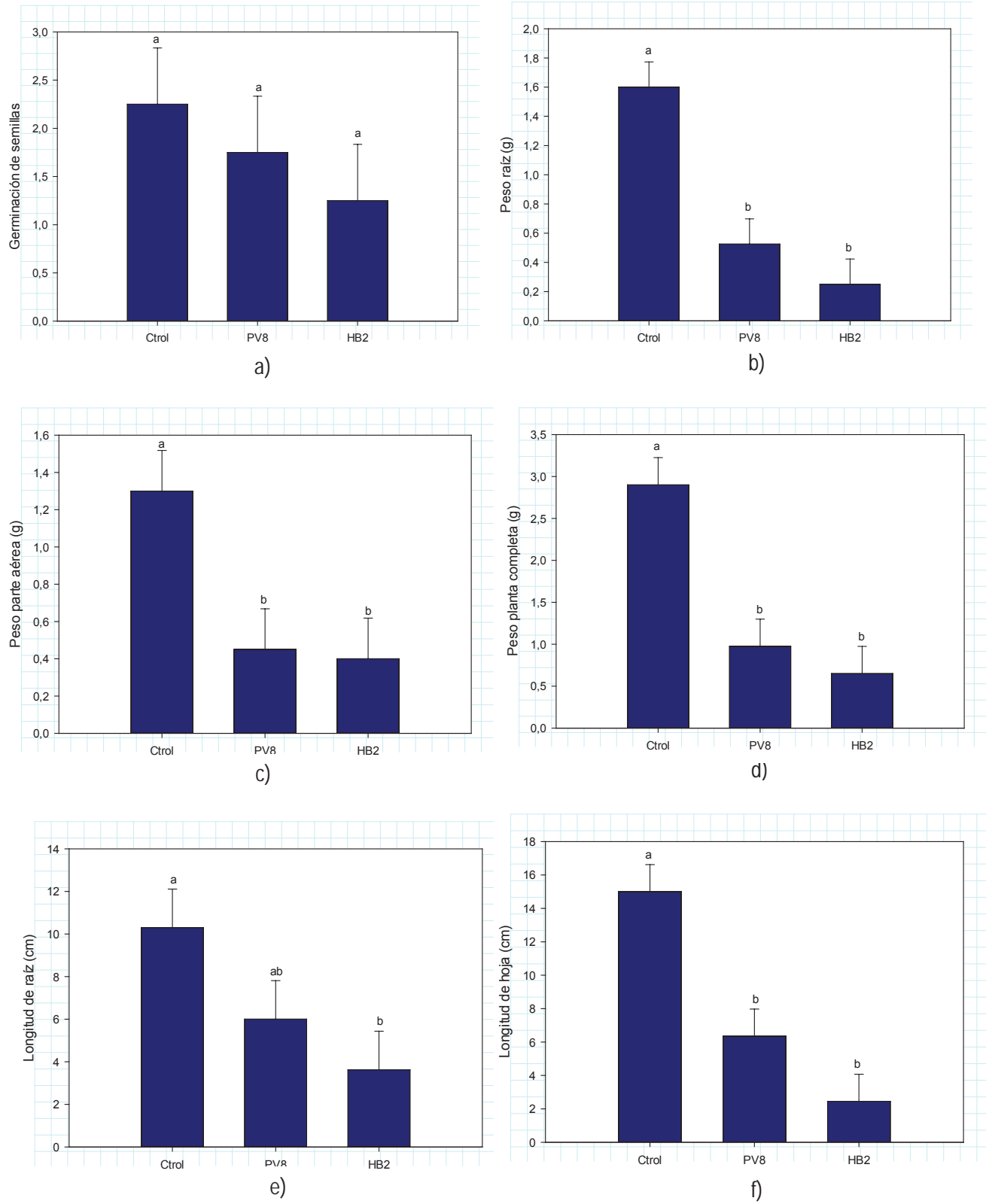


Figura 6. Evaluación del efecto de dos cepas de Pythium en: a) Germinación de semillas; b) Peso raíz; c) Peso tallo; d) Peso planta; e) Longitud Raíz; f) Longitud hoja

**FASE 3: Evaluación del efecto del HMA en su fase pre-simbiótica contra *Pythium* en maíz.**

Al llevar a cabo la cosecha de las plantas, después de dos semanas, no se observaron síntomas de enfermedad en las raíces (decoloración), aunque en algunos casos las raíces que contenían al patógeno eran muy delgadas o había una cantidad muy pequeñas de ellas.

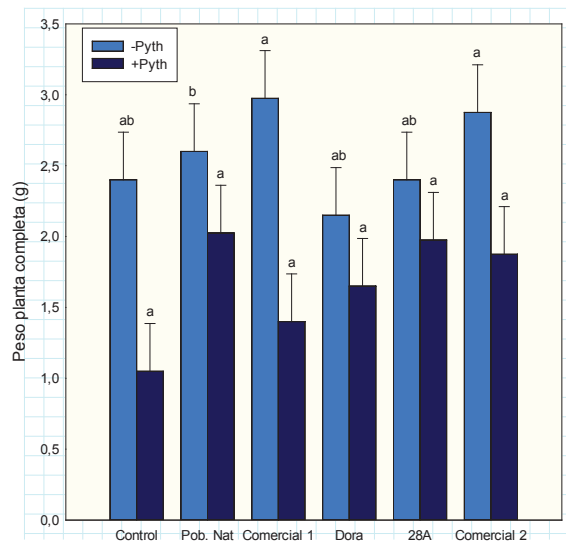
Al realizar el análisis de varianza de las variables evaluadas, se pudo observar que en ninguno de los casos hubo un efecto de los inóculos de HMA hacia el patógeno (Tabla 3). Entre los inóculos de HMA no hubo una diferencia significativa para las variables evaluadas, excepto en la longitud de las hojas. Sin embargo, se puede apreciar que los inóculos *Glomus intraradices* (28A) y población nativa, tuvieron cierto efecto contra *Pythium* al compararlas con su control (Figura 7).

Con respecto a *Pythium*, el patógeno tuvo un efecto en el peso de la planta completa, peso de raíz, longitud de raíz y hojas y las semillas germinadas (Tabla 3).

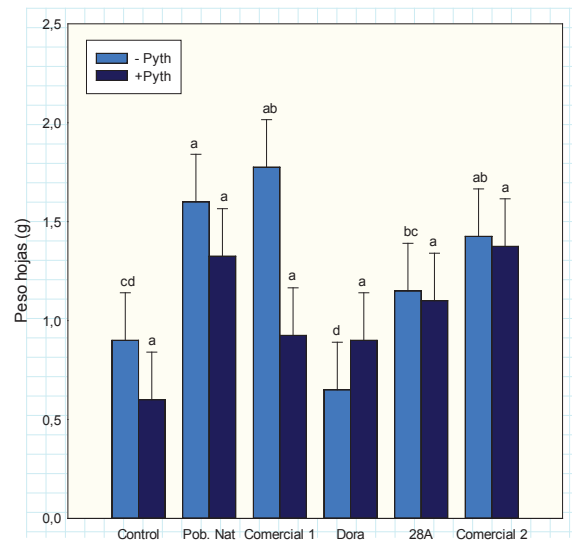
Tabla 3. Efecto de los HMA en la fase presimbiótica contra *P. ultimum*. Donde: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$

**ANÁLISIS DE VARIANZA Valores de P**

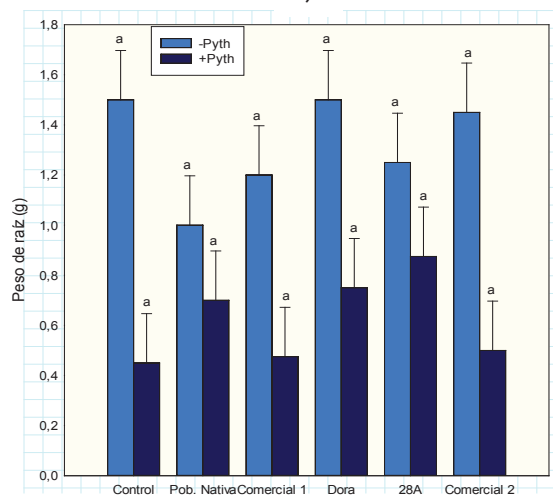
	<b>Peso planta</b>	<b>Peso raíz</b>	<b>Peso hoja</b>	<b>Longitud de hoja</b>	<b>Longitud Raíz</b>	<b>Semillas germinadas</b>
<b>HMA</b>	0.369	0.651	*	0.458	0.974	0.99
<b><i>Pu</i></b>	***	***	0.134	**	***	*
<b>A*B</b>	0.417	0.342	0.334	0.083	0.739	0.99



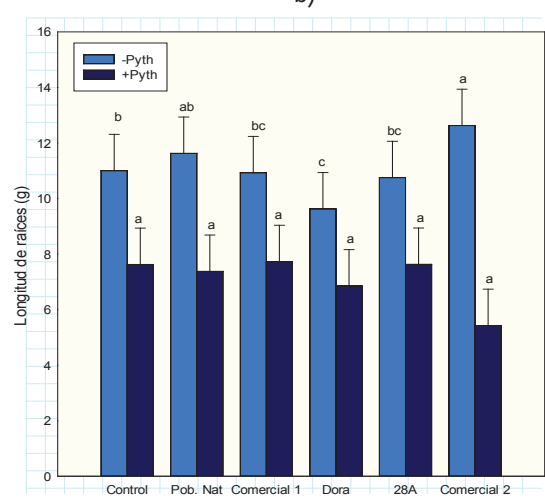
a)



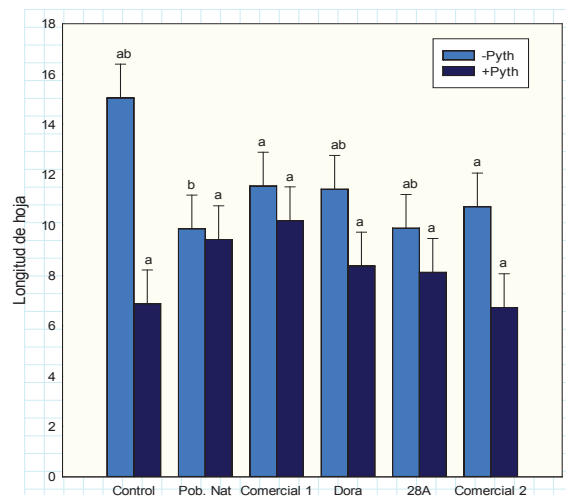
b)



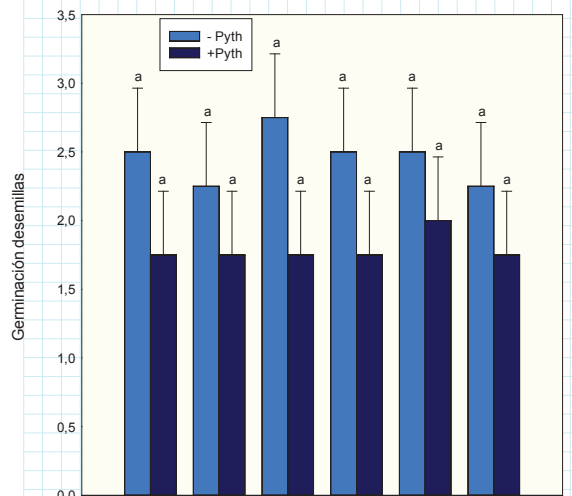
c)



d)



e)



f)

Fig. 7. Efecto de los diferentes tipos de inóculo de HMA en su etapa pre-simbiótica contra Pythium. a)Peso planta; b) Peso hojas; c) Peso raíz; d) Longitud raíz; e) Longitud hojas; f) Germinación de semillas

#### FASE 4: Evaluación del efecto de biocontrol de los HMA y sus microorganismos asociados.

##### Desempeño del crecimiento vegetal

Al realizar la cosecha, se pudo observar que las plantas no mostraron ningún efecto aparente en la parte aérea con la inoculación con *Pythium*. Al lavar las raíces, algunos tratamientos mostraron cierto oscurecimiento, sin embargo en ninguno de los casos hubo una clara pudrición de la raíz.

El análisis de varianza para el peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz se puede resumir como se muestra en la Tabla 4. En las variables examinadas se puede observar que los pesticidas no tuvieron ningún efecto significativo, y además no existen interacciones entre los tres factores evaluados para ninguna de las variables. Tampoco hubo efecto entre las interacciones entre pesticidas-HMA y pesticidas - *P. ultimum*. Sin embargo hubo una tendencia a un efecto significativo en la interacción entre HMA y *P. ultimum*.

Tabla 4. Valores de probabilidad (P) a partir del análisis de varianza de los parámetros medidos con *Pythium ultimum*, HMA y pesticidas como factores principales y sus interacciones (n=4). Donde: \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001  $\alpha$

Variables	ANOVA Valores de P						
	HMA (A)	<i>P. ultimum</i> (B)	Pesticidas (C)	A*B	A*C	B*C	A*B*C
Peso seco pte. aérea	***	0.969	0.247	0.073	0.118	0.174	0.373
Peso seco raíz	***	*	0.627	0.069	0.142	0.859	0.498

Debido a estos resultados se realizó un análisis de varianza incluyendo solo los factores con respuesta significativa con HMA y *P. ultimum*, cómo se muestra en la Tabla 5. En este caso, un efecto significativo de *P. ultimum* en el peso seco de la raíz fue observado (Tabla 5), sin embargo en la parte aérea no hubo efecto. Las dos variables examinadas fueron significativamente afectadas por los HMA. Por otro lado se observó una tendencia a un efecto significativo en la interacción de los dos factores en el peso seco de la raíz ( $P= 0.068$ , Tabla 5).

Tabla 5. Valores de probabilidad (P) a partir del análisis de varianza de los parámetros medidos con *Pythium ultimum* y HMA como factores principales y su interacción (n=16). Donde: \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001

ANOVA Valores de P			
Variables	HMA (A)	<i>P. ultimum</i> (B)	A*B
Peso seco parte aérea	***	0.970	0.090
Peso seco raíz	***	*	0.068

La inoculación con *G. intraradices* aumentó el peso seco aéreo de las plantas de maíz al compararlas con el control y los otros inóculos de HMA (Fig. 8). Los inóculos MTZUV y Población Nativa no tuvieron efecto en el peso seco aéreo (Fig. 8).

Por otro lado, la inoculación con *P. ultimum* no tuvo efecto en el peso seco aéreo independientemente de la presencia de los inóculos de HMA (Fig.8).

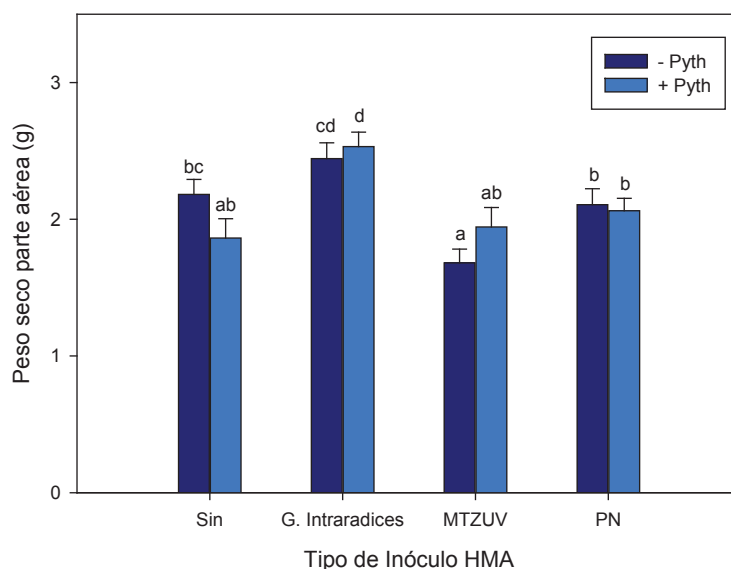
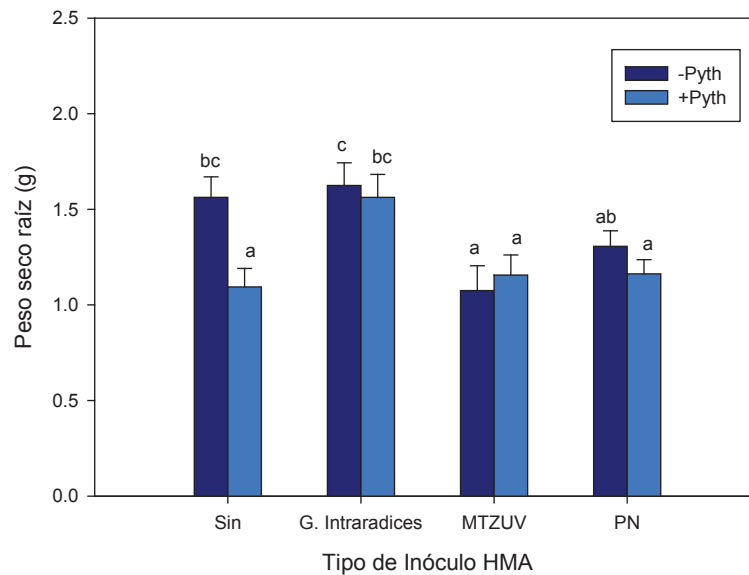


Figura 8. Peso seco de la parte aérea de las plantas de maíz con o sin la inoculación de *P. ultimum* y con y sin inoculación de HMA. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos (n=16). Las diferentes letras arriba de las barras indican diferencia significativa entre los tratamientos.

En cuanto al peso seco de la raíz, hubo un efecto claro por parte de *P. ultimum* en las plantas sin inóculos de HMA, en donde hubo una diferencia significativa en el peso en comparación con las plantas que no fueron inoculadas con el patógeno (Fig. 9), no así en los tratamientos con los diferentes tipos de inóculo de HMA, lo cual muestra un efecto de control biológico por parte de los HMA. Las raíces de las plantas de maíz inoculadas con *G. intraradices* tuvieron un peso mayor a las plantas inoculadas con MTZUV y población nativa (Fig. 9).



**Figura 9.** Peso seco de las raíces de las plantas de maíz con o sin la inoculación de *P. ultimum* y con y sin inoculación de HMA. Las diferentes letras arriba de las barras, indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos (n=16). Las diferentes letras arriba de las barras indican diferencia significativa entre los tratamientos.

### Colonización radical con HMA

Con respecto a la colonización de raíces con HMA, se observó que hubo una diferencia significativa entre los diferentes tipos de inóculo de HMA y los tratamientos con y sin pesticidas (Tabla 6).

Ningún efecto significativo de la inoculación con el patógeno *P. ultimum* fue observado en los tratamientos con los diferentes pesticidas. Sin embargo una interacción significativa entre los HMA y *P. ultimum* fue observada en todos los casos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Valores de probabilidad (P) a partir del análisis de varianza de la colonización de raíces, con *Pythium ultimum* y HMA como factores principales y su interacción (n=4).

Donde: \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001

ANOVA Valores de P			
Pesticidas	HMA (A)	<i>P.ultimum</i> (B)	A*B
Sin	***	0.660	*
Agromicina	***	0.204	**
Benomil	***	0.780	*
Agro+Beno	***	0.751	*

En general, las plantas que fueron sometidas a la aplicación de Agromicina, mostraron tener el nivel mas alto de colonización, a las que se le aplicaron la combinación de Agromicina y Benomil tuvieron un nivel medio y las que fueron aplicadas con Benomil tuvieron el nivel más bajo de colonización (Tabla 7). Respecto a los tipos de inóculo de HMA utilizados, el consorcio MTZUV tuvo el mayor nivel de colonización, seguido muy de cerca por *G. intraradices*. Las raíces de las plantas con el inóculo de población nativa, fueron las menos colonizadas (Tabla 7).

**Tabla 7.** Promedios del porcentaje de colonización de HMA de las raíces inoculadas con los hongos micorrízicos *Glomus intraradices*, MTZUV y Población Nativa con y sin aplicación de los diferentes pesticidas. Las diferentes letras indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos (n=4).

Tratamientos			Pesticidas		
HMA	<i>Pythium</i>	0	Agromicina	Benomil	Agro+Benomil
Sin	-	2.7 ab	0.5 a	0.2 a	0.7 a
G.Intraradices	-	50.7 lm	57.2 m	28.5 ghij	34.0 hij
MTZUV	-	51.5 lm	53.0 lm	31.7 ghij	41.2 ljkl
P.Nativa	-	40.2 ijklm	50.0 klm	15.7 def	28.2 fghij
Sin	+	8.5 bcd	11.7 cde	2.7 ab	7.0 bc
G.Intraradices	+	50.5 klm	61.5 m	20.2 efg	21.2 efg
MTZUV	+	51 lm	58.7 m	26.7 fghi	26.2 fghi
P.Nativa	+	22.2 efg	34.0 ghij	20.2 efg	35.7 ljk

## **Biomarcadores de ácidos grasos**

En los tratamientos en los que fueron aplicados el pesticida Agromicina, se pudo observar que hubo cierto efecto por parte de los HMA hacia el grupo de biomarcadores de ácidos grasos de las bacterias Gram negativas ( $P=0.084$ , Tabla 8).

En el caso de los tratamientos con Benomil, la inoculación con HMA afectó significativamente a los biomarcadores de las bacterias Gram negativas y Gram positivas. Por otro lado la inoculación con el patógeno *P. ultimum* tuvo un efecto significativo en los biomarcadores de las bacterias Gram negativas, Gram positivas y Actinomicetes. Además una interacción significativa entre los factores HMA y *P. ultimum* fue observada en los grupos Gram negativas, Gram positivas y Actinomicetes (Tabla 8).

Respecto a los tratamientos con la combinación Agromicina+Benomil, fue posible observar cierto efecto por parte de los HMA en los biomarcadores de los Actinomicetes ( $P=0.063$ , Tabla 8). Un efecto significativo por parte del patógeno *P. ultimum* fue observado en el grupo de las bacterias Gram negativas en los tratamientos donde fue aplicada esta combinación de pesticidas (Tabla 8).

En general, en la inoculación con MTZUV se observó una disminución en la cantidad de los biomarcadores de ácidos grasos de las bacterias Gram negativas y Gram positivas respecto a los otros inóculos de HMA en los tratamientos con los diferentes pesticidas (Tabla 9). Sin embargo en el caso de los hongos saprófitos el efecto fue contrario, es decir, hubo un aumento de este grupo de biomarcadores con el inóculo MTZUV en comparación a los otros tipos de inóculo.

**Tabla 8.** Valores de probabilidad (P) a partir del análisis de varianza de los biomarcadores de ácidos grasos agrupados en los diferentes grupos de microorganismos como factores principales y su interacción (n=4). Donde: \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001

ANOVA Valores de P				
Pesticidas	Grupo de microorganismos	HMA (A)	P. ultimum (B)	A*B
Sin	Gram -	**	***	*
Sin	Gram +	**	**	0.282
Sin	Actinomicetes	0.312	0.519	0.589
Sin	HMA	***	0.476	**
Sin	Hongos	0.3	0.204	0.998
Agromicina	Gram -	0.084	0.256	0.2
Agromicina	Gram +	0.259	0.096	0.845
Agromicina	Actinomicetes	0.068	0.918	0.214
Agromicina	HMA	***	0.362	0.511
Agromicina	Hongos	0.511	0.306	0.733
Benomil	Gram -	***	**	**
Benomil	Gram +	***	**	***
Benomil	Actinomicetes	0.189	*	*
Benomil	HMA	***	0.083	*
Benomil	Hongos	0.654	0.303	0.443
Agro+Beno	Gram -	0.228	**	0.107
Agro+Beno	Gram +	0.297	0.908	0.536
Agro+Beno	Actinomicetes	0.063	0.976	0.198
Agro+Beno	HMA	**	*	**
Agro+Beno	Hongos	0.317	0.111	0.165

Tabla 9. Cantidad de biomarcadores de ácidos grasos específicos de los diferentes grupos de microorganismos en el suelo. Las diferentes letras indican una diferencia estadísticamente significativa entre las medias en cada fila (n=4)

	Tratamientos			Gram -	Gram +	Actinomicetes	HMA	Hongos					
	HMA	Pythium	Pesticidas										
	Sin	-	-	27.43	bc	48.03	a	26.34	a	7.42	c	4.78	a
G. Intraradices	-	-	-	25.52	c	42.38	bcd	21.85	a	19.96	a	7.46	a
MTZUV	-	-	-	25.1	c	39.31	d	24.91	a	17.92	a	8.92	a
P.Nativa	-	-	-	26.82	bc	42	cd	22.52	a	20.31	a	5.31	a
	Sin	+	-	33.82	a	47.78	a	26.134	a	11.26	b	3.34	a
G. Intraradices	+	-	-	36.85	a	46.74	ab	25.63	a	13.93	b	4.21	a
MTZUV	+	-	-	24.46	c	44.67	abc	24.01	a	19.15	a	7.31	a
P.Nativa	+	-	-	32	ab	44.63	abc	23.2	a	18.86	a	4.02	a
	Sin	-	Agromicina	31.75	a	47.82	a	24.86	abc	10.22	d	4.64	a
G. Intraradices	-	-	Agromicina	30.6	a	44.26	ab	24.15	abc	18.35	abc	4.15	a
MTZUV	-	-	Agromicina	23.11	b	42.32	ab	26.58	ab	19.4	abc	5.89	a
P.Nativa	-	-	Agromicina	31.72	a	42.26	ab	21.24	c	21.37	ab	3.28	a
	Sin	+	Agromicina	32.72	a	42.94	ab	27.16	a	9.56	a	4.48	a
G. Intraradices	+	-	Agromicina	32.07	a	42.79	ab	23	bc	14.07	cd	6.53	a
MTZUV	+	-	Agromicina	30.28	a	37.68	b	23.83	abc	16.69	bc	6	a
P.Nativa	+	-	Agromicina	29.29	ab	39.43	b	23.25	abc	23.36	a	4.78	a
	Sin	-	Benomil	33.97	ab	47.04	ab	26.82	abc	4.18	d	8.102	a
G. Intraradices	-	-	Benomil	30.18	bc	48.06	ab	29.22	a	10.16	ab	4.09	a
MTZUV	-	-	Benomil	26.46	c	43.75	b	26.77	abc	10.41	ab	5.85	a
P.Nativa	-	-	Benomil	32.71	abc	46.8	ab	27.75	ab	9.78	ab	4.59	a
	Sin	+	Benomil	38.09	a	50.7	a	30.16	a	7.66	c	4.78	a
G. Intraradices	+	-	Benomil	34.38	ab	45.14	ab	23.6	bc	9.053	bc	5.66	a
MTZUV	+	-	Benomil	15.53	d	24	c	23.9	bc	9.96	ab	8.09	a
P.Nativa	+	-	Benomil	18.4	d	45.84	ab	22.74	c	11.44	a	5.6	a
	Sin	-	Agro+Benom	29.36	cd	45.26	ab	24.95	ab	6.22	c	11.7	a
G. Intraradices	-	-	Agro+Benom	27.74	cd	44.59	ab	27.67	a	11.17	ab	4.74	ab
MTZUV	-	-	Agro+Benom	23.23	d	43.22	ab	24.07	ab	8.93	bc	9.2	ab
P.Nativa	-	-	Agro+Benom	34.03	abc	44.03	ab	24.43	ab	12.6	a	5.45	ab
	Sin	+	Agro+Benom	37.71	ab	48.07	ab	28.35	a	12.32	ab	2.6	b
G. Intraradices	+	-	Agro+Benom	39.17	a	18.9	a	25.56	ab	10.41	ab	4.02	b
MTZUV	+	-	Agro+Benom	33.87	abc	40	b	21.4	b	10.035	ab	7.9	ab
P.Nativa	+	-	Agro+Benom	31.09	bc	44.66	ab	25.67	ab	11.91	ab	5.3	ab

Con la finalidad de conocer el efecto de los HMA y *P. ultimum* en las poblaciones microbianas en el suelo sin considerar el efecto que posiblemente podrían llevar a cabo los pesticidas, se analizó de manera detallada la respuesta de cada uno de los biomarcadores de ácidos grasos cuya presencia fue consistente en las muestras de suelo, sin la presencia de pesticidas y de manera individual (Tablas 10 y 11).

De esta forma se pudo observar que la inoculación con los diferentes tipos de inóculo de HMA afectó a la mayoría de los grupos de biomarcadores excepto a los hongos saprófitos y a las bacterias Gram negativas con el biomarcador 19:0 cyclo (Tabla 10). En general, se pudo observar una disminución en las poblaciones de bacterias Gram negativas y Gram positivas con el inóculo MTZUV

Por su parte la inoculación del patógeno *P. ultimum* tuvo un efecto en las poblaciones con los biomarcadores 19:0 cyclo (Gram -), 15:0 ISO, 15:0 ANTEISO, 16:0 ISO (Gram +) (Tabla 10), en donde se observó un incremento en las poblaciones de estos microorganismos (Tabla 11), y 18:1 $\omega$ 9 (Hongos saprófitos) (Tabla 10) donde hubo una disminución de la población de estos hongos al estar en contacto con el patógeno (Tabla 11).

Una interacción significativa entre los factores HMA y *P. ultimum* fue observada en los biomarcadores 15:0 ISO, 15:0 ANTEISO (Gram +) y 16:1 $\omega$ 5c (HMA) (Tabla 10). En el caso del ácido graso 15:0 ISO en los tratamientos con *G. intraradices*, se observó un incremento en la población de estas bacterias en donde hubo inoculación con el patógeno *P. ultimum* (Tabla 11). En cuanto al biomarcador 15:0 ANTEISO, hubo un aumento en estos microorganismos en los tratamientos con MTZUV que fueron inoculados con *P. ultimum* (Tabla 11). Por otro lado, 16:1 $\omega$ 5 tuvo una disminución en la población de estos hongos en donde hubo presencia del patógeno en los tratamientos con *G. intraradices*.

**Tabla 10.** Análisis de varianza de los biomarcadores de ácidos grasos de los diferentes grupos de microorganismos en tratamientos sin pesticidas (n=4).

Donde: \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001

ANOVA Valores de P

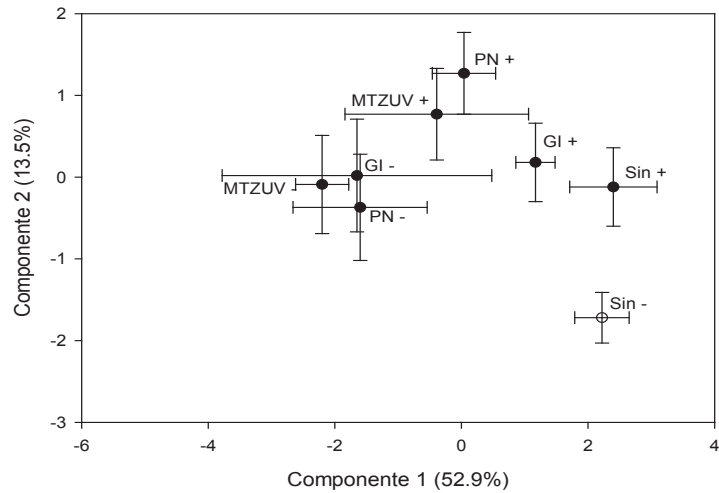
	GRAM -		GRAM +					ACTINOMICETES		HONGOS SAPRO.		HMA
	17:0 Cyclo	19:0 Cyclo	15:0 ISO	15:0 Antelso	16:0 ISO	17:0 ISO	17:0 Antelso	16:0 10 Me	17:0 10 Me	18:2ω6,9	18:1ω9	16:1 ω5c
HMA (A)	**	0.388	*	**	*	*	**	**	*	0.313	0.627	***
<i>P. ultimum</i> (B)	0.091	*	***	**	*	0.940	0.647	0.285	0.575	0.232	**	0.475
A*B	0.168	0.674	*	*	0.675	0.844	0.944	0.586	0.650	0.995	0.910	**

**Tabla 11.** Medias de los biomarcadores de ácidos grasos de los diferentes microorganismos en los tratamientos sin pesticidas (n=4).

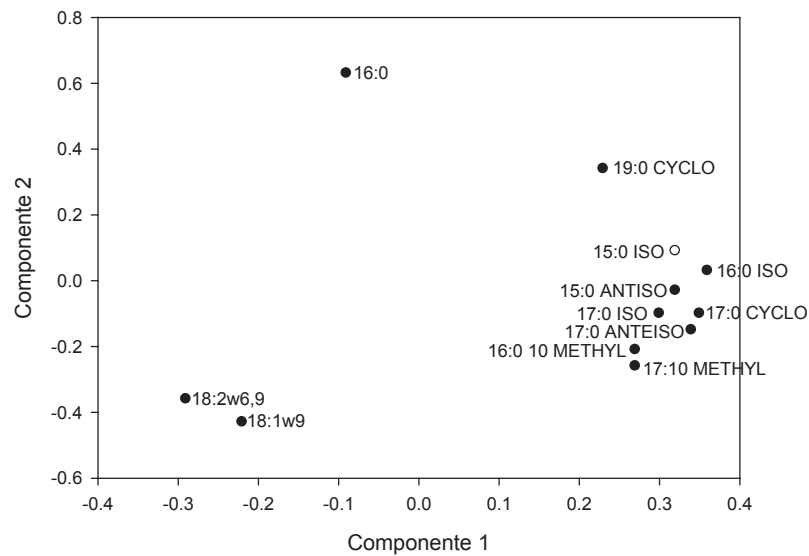
Tratamientos		GRAM -		GRAM +					ACTINOMICETES		HONGOS GRAL		HMA
HMA	Pythium	17:0 Cyclo	19:0 Cyclo	15:0 ISO	15:0 Antelso	16:0 ISO	17:0 ISO	17:0 Antelso	16:0 10 Me	17:0 10 Me	18:2 ω6,9	18:1 ω9	16:1 ω5c
-	-	7.5 bc	7.5 ab	13.0 b	11 c	10 b	7.0 ab	7.3 b	12 c	7.2 b	13 a	17 b	7.4 a
28 <sup>a</sup>	-	6.7 ab	6 a	11.0 a	8.8 ab	9.4 ab	6.5 ab	6.5 a	8.9 a	6 a	14 a	17 ab	20 c
MTZUV	-	6.7 a	7.1 ab	9.8 a	7.8 a	8.8 a	6.5 ab	6.5 a	9.3 a	6.6 ab	17 a	17 ab	18 c
PN	-	6.3 a	6 a	11.0 a	9.1 b	9.4 ab	6.1 a	6.3 a	9.1 a	6.3 ab	13 a	16 ab	20 c
-	+	7.5 bc	8 b	13.0 b	10 c	10 b	7.2 b	7.4 b	11 c	6.9 ab	11 a	16 ab	11 b
28A	+	7.6 c	7.5 ab	13.0 b	10 c	10 b	6.5 ab	6.8 ab	9.7 ab	6.3 a	12 a	16 ab	14 b
MTZUV	+	6.5 a	8 b	12.0 ab	9.9 bc	9.7 ab	6.2 a	6.5 a	10 abc	6.1 a	15 a	16 ab	19 c
PN	+	6.9 abc	7.9 b	12.0 ab	9.8 bc	9.8 b	6.3 ab	6.3 a	9.5 a	6.3 ab	12 a	15 a	19 c

El conjunto de datos de ácidos grasos microbianos también fue sometido a un análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 10). Se puede observar en el análisis de la Fig. 10a que los componentes 1 y 2 tuvieron respectivamente un 52.9% y un 13.15% de varianza en los datos. En el componente 1 es posible ver una clara separación entre los tratamientos sin y con HMA, sin embargo entre los diferentes tipos de inóculo de HMA no hubo una evidente diferencia. Por otro lado, en el componente 2 (Fig. 10a) se puede observar que los tratamientos sin *P. ultimum* difieren de los que fueron inoculados con el patógeno al encontrarse separados unos de los otros.

Los biomarcadores de ácidos grasos 19:0 cyclo, 15:0 ISO y 16:0 ISO son los que mejor explican la separación o diferencia entre los tratamientos sin y con *P. ultimum* en el componente 2 (Fig. 10b), y los biomarcadores 16:0 ISO y 17:0 Cyclo explican la separación encontrada entre los tratamientos con los diferentes tipos de inóculo de HMA en el componente 1.



a)



b)

Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles de ácidos grasos microbianos obtenidos a partir del análisis conjunto de lípidos celulares de suelo con y sin *Pythium ultimum* y con y sin HMA, en tratamientos sin pesticidas.

## VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo fue evaluado el efecto de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) y de los microorganismos del suelo asociados a ellos como agentes de control biológico contra el patógeno *Pythium ultimum*. En general, los HMA mostraron tener un efecto de biocontrol en contra del patógeno. Los microorganismos del suelo que se encuentran asociados a los HMA tuvieron un efecto indirecto contra *P. ultimum*.

### **Los HMA y su influencia en el desempeño vegetal**

Los HMA, en la mayoría de los casos, incrementan el crecimiento y rendimiento de las plantas de maíz (ej. Gavito y Varela, 1995., Hu *et al.*, 2009., Mickelson y Kaeppeler, 2005). En este estudio hubo variadas respuestas por parte de las plantas inoculadas con los diferentes tipos de HMA, algunas de ellas fueron favorables como fue el caso de las plantas inoculadas con *Glomus intraradices*. Sin embargo, fue posible observar que el inóculo Comercial 2 causó una disminución en el crecimiento general de la planta. Este tipo de supresión en el crecimiento de las plantas al ser colonizadas por HMA ha sido observada en otros estudios con otras especies de plantas como *Cucumis sativa* (ej, Welc, 2010). Esto puede ser debido a que el rendimiento de una planta hospedera depende en gran medida del tipo de HMA al que se encuentre asociado (Jakobsen *et al.*, 1992). Mickelson y Kaeppeler (2005) en su estudio con siete genotipos de maíz encontraron una variación significativa entre los diferentes HMA que utilizaron para promover el crecimiento de estas plantas, y en cuanto a los genotipos del maíz observaron un efecto relativamente pequeño entre ellos respecto a la colonización y los beneficios del crecimiento, situación similar a la presentada en este estudio.

De acuerdo con Munkvold y colaboradores (2004) los efectos de los HMA en las plantas pueden variar considerablemente con respecto a una amplia gama de características funcionales, incluso dentro de la misma especie.

En cuanto al desempeño vegetal respecto a las variedades de maíz utilizadas en este estudio no se encontró diferencia estadísticamente significativa, aunque la variedad NB9 tuvo un mejor rendimiento en general, razón por la cual fue utilizada para los experimentos posteriores.

### **Efecto de *Pythium* en el desempeño vegetal**

Algunas especies de *Pythium* han sido consideradas como patógenos de los cultivos de maíz, sin embargo *Pythium ultimum* no se considera un patógeno importante en estas plantas. Sin embargo, en el presente estudio se pudieron observar efectos perjudiciales por parte de las cepas probadas de este patógeno, como una disminución en el peso y crecimiento general de las plantas. Estos síntomas han sido reportados por otras especies de *Pythium* (*P. adhaerens*, *P. angustatum*, *P. graminicola*) en plantas de maíz (Van de Plaats-Niterink, 1981). Aunque el rendimiento de las plantas no fue medido en este estudio, es posible que *P. ultimum* cause un daño potencial en el rendimiento de las plantas.

### **HMA como agente de control biológico.**

En la actualidad se han realizado muchas investigaciones que demuestran que los HMA pueden reducir la incidencia de enfermedades de las raíces de las plantas causadas por patógenos y en específico por *P. ultimum* (St Arnaud *et al.*, 1994; Larsen *et al.*, 2003; Bin Li *et al.*, 2007; Larsen *et al.*, 2011). Sin embargo, pocos estudios se han hecho acerca de los HMA como agentes de control biológico en su etapa pre-simbiótica, ya que la mayoría de estos sugieren que el control biológico hacia los patógenos solo es posible cuando los HMA están bien establecidos en las raíces de la plantas. Fitter y Garbaye, (1994) encontraron que los efectos de biocontrol por parte de las micorrizas se llevan a cabo en todas las etapas de su ciclo de vida, incluyendo la fase pre-simbiótica desde la cual ya es posible tener efectos inhibitorios o de competencia hacia el patógeno. En la fase tres de la presente investigación fue posible observar efectos por parte de los HMA en su fase pre-simbiótica para mitigar los efectos producidos por *P. ultimum*. Estos efectos de biocontrol observados pudieron deberse a un reconocimiento por parte de la planta hacia el hongo micorrízico lo que pudo haber generado la activación de su sistema de defensa mediante señales específicas (elicitors), (Requena *et al.*, 2007) con lo cual posiblemente la planta haya sido menos susceptible a ser atacada por parte del patógeno.

Por otro lado, es bien conocido que al estar presentes las esporas de los HMA, los exudados de las raíces de las plantas cambian, conteniendo diferentes tipos de compuestos y hormonas que favorecen la germinación de esporas, el crecimiento y ramificación de la hifa germinativa y la localización de las raíces del hospedero (Akiyama *et al.*, 2005; Requena *et al.*, 2007). Este cambio de exudados de la raíz provoca además una modificación en las comunidades microbianas del suelo, en donde hay bacterias que pueden ser antagonistas de patógenos de la raíz, lo cual pudo tener una influencia indirecta para el control de *Pythium* en esta fase pre-simbiótica.

Tampoco se puede descartar la posibilidad de que microorganismos que se encuentran en los inóculos hayan jugado un papel importante en el control del patógeno (Thygesen *et al.*, 2004) con lo cual se confirmaría la hipótesis planteada en este proyecto de tesis. Li y colaboradores (2007) demostraron que las bacterias *Paenibacillus* asociadas a los HMA, poseen grandes propiedades contra el “damping-off” u ahogamiento en plantas de pepino producido por *Pythium*, y que estas bacterias también pueden desempeñar un papel activo en las propiedades del control biológico de los HMA.

Cabe resaltar que al terminar el experimento de la fase tres, no se llevaron a cabo estudios para determinar la fase de desarrollo en que se encontraban las esporas, y tampoco comprobamos si había algún grado de colonización por parte de los HMA en las raíces de las plantas, por lo que creemos que sería importante incluir estas variables en el futuro.

En la fase cuatro de este estudio (evaluación del efecto de biocontrol de los microorganismos asociados a los HMA) un efecto de control biológico fue observado en el peso seco de las raíces de las plantas por parte de los tres inóculos utilizados. Con los resultados obtenidos en este proyecto no es posible decir algo acerca el modo de acción de biocontrol por parte de los inóculos de HMA, sin embargo en numerosos estudios se ha propuesto que los cambios físicos y fisiológicos en las plantas micorrizadas, así como la interacción directa entre los HMA y patógenos, pueden estar relacionados con el control biológico de los patógenos (Linderman, 1994; Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Whipps, 2004).

Por otro lado, el esfuerzo por tratar de manipular los microorganismos asociados a los HMA para comprobar su efecto en el control de *Pythium* no fue

logrado debido a que la aplicación del bactericida utilizado no afectó suficientemente a las bacterias, por lo que no se pudo generar un contraste para poder llevar a cabo nuestro objetivo.

### **Interacción *Pythium*-HMA**

En la fase tres de esta investigación fue posible observar que a los 14 días de la siembra y la inoculación con el patógeno *P. ultimum*, este último tuvo un efecto en los diferentes inóculos de HMA utilizados, que se reflejó en una inhibición en los hongos para favorecer el crecimiento de la raíz en la planta. Sin embargo, en la fase cuatro no se observó efecto evidente por parte del patógeno hacia los inóculos de HMA.

Existen pocos estudios acerca de los efectos que tienen los patógenos sobre los HMA. En algunos de estos se ha encontrado que puede existir una inhibición mutua entre ambos grupos de organismos (Thygesen *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2011). En su estudio Larsen y Bodker (2001) encontraron que una posible causa de esta inhibición mutua entre los patógenos de la raíz y los HMA se deba a la competencia por los fotosintatos.

### **Influencia de la interacción HMA-*Pythium* en los microorganismos en la rizósfera**

Es conocido que los HMA interactúan con varios grupos de microorganismos de la rizósfera y que las raíces colonizadas por HMA afectan las comunidades microbianas asociadas con las raíces (Paulitz y Linderman, 1991; Mansfeld-Giese, *et al.*, 2002; Albertsen *et al.*, 2006). En el experimento de la fase 4, fue posible observar que en general la presencia de los diferentes tipos de inóculo de HMA tuvo un efecto en la comunidad bacteriana (Gram+ y Gram -), donde hubo una disminución de estos organismos, especialmente en el inóculo MTZUV. Otros estudios han reportado que en presencia de los HMA las comunidades bacterianas pueden verse afectadas en su población debido a los cambios en los exudados de las raíces o de los hongos (Linderman, 1992), y estos cambios se pueden ver reflejados en un incremento (Krishnaraj y Sreenivasa, 1992) o en una disminución de sus poblaciones (Ames *et al.*, 1984). En cuanto al grupo de los actinomicetes, la presencia de los HMA no modificó la comunidad de estos microorganismos. Lo mismo ocurrió con los

hongos saprófitos en donde no hubo aumento ni disminución en las poblaciones de estos microbios. Aunque es conocido que los HMA interactúan con los hongos saprófitos, otros autores han tenido resultados similares a los presentados en este proyecto, en cuanto a que los HMA utilizados en sus investigaciones no han afectado las comunidades microbianas (Waschkies *et al.*, 1994).

Por otro lado, la presencia de *Pythium* tuvo diferentes efectos en las poblaciones bacterianas Gram + y Gram – de acuerdo al tipo de inóculo de HMA, en donde en la mayoría de estos se pudo observar un incremento en la comunidades bacterianas. Los actinomicetos y hongos saprófitos no sufrieron cambios en su población en presencia del patógeno. En nuestro conocimiento, no existe ningún trabajo de investigación acerca de la interacción de *Pythium ultimum* con los microorganismos del suelo.

## IX. CONCLUSIONES

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares tienen una compatibilidad diferencial con las plantas de maíz, de acuerdo al genotipo de la planta y al tipo de inóculo de HMA.

*Pythium ultimum* es un patógeno menor de las plantas de maíz, ya que no causa daños importantes en el crecimiento de estas plantas.

Existe cierto efecto por parte de los HMA en su etapa pre-simbiótica para mitigar los efectos de *Pythium ultimum* en plantas de maíz.

Los HMA al colonizar las raíces de las plantas de maíz poseen propiedades para controlar al patógeno *Pythium*.

No fue posible asegurar que los microorganismos asociados a los HMA ejercen una influencia en el control del patógeno, debido a que no se logró controlar a las bacterias con el pesticida utilizado.

Cambios en las comunidades microbiológicas de la rizósfera fueron observados en presencia de los HMA. Estas modificaciones en las poblaciones específicamente de bacterias pudieron jugar un papel importante en el modo de acción para el control del patógeno, al actuar como microorganismos antagonistas.

La inoculación con *Pythium ultimum* ocasionó cambios en las comunidades microbianas en la rizósfera de las plantas de maíz.

La modificación en las comunidades de los microorganismos del suelo en presencia de *P. ultimum* podría estar involucrada en la activación del sistema de defensa de la planta.

## X. REFERENCIAS

**Agrios G.** 2010. Fitopatología. Limusa, México, D. F. ISBN 978-968-18-5184-2. 838 pp

**Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H.** 2005. Plant Sesquiterpenes Induce Hyphal Branching in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Nature* 435, 824-827

**Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C,** 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* 184: 529–544.

**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.

**Albertsen A, Ravnskov S, Green H, Jensen D, Larsen J,** 2006. Interactions between the external mycelium of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and other soil organisms as affected by organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1008–1014.

**Altieri M.** 1999. AGROECOLOGIA: bases científicas para una agricultura sustentable. Ed. Nordan- Comunidad, Uruguay.

**Ames R, Reid C, Ingham E,** 1984. Rhizosphere bacterial populations responses to root colonization by vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytology* 96, 555–563.

**Artursson V, Finlay R, Jansson J.** 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8, 1-10.

**Auge R.** 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3–42

**Ayers W, Lumsden R.** 1975. Factors Affecting Production and Germination of Oospores of Three Pythium Species. *Phytopathology* 65, 1094-1100.

**Azcón- Aguilar C, Barea JM.** 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens, an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*. 6, 457-464

**Azcon-Aguilar C, Jaizme-Vega MC, Calvet C.** 2002. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-born plant pathogens. In: Gianinazzi S, Schuepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) *Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to byproducts*. Birkhauser Verlag, Switzerland, pp 187–197

**BareaJM, Azcón R, Ocampo J.** 1991. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. Consejo superior de Investigaciones científicas 2, 149-173.

**Bethlenfalvay GJ, Andrade G, Azcon-Aguilar C.** 1997. Plant and soil responses to mycorrhizal fungi and rhizobacteria in nodulated and nitrate-fertilized peas (*Pisum sativum* L.). *Biology and Fertility of Soils* 24, 164–168.

**Bianciotto V, Bandi C, Minerdi D, Sironi M, Tichy H, y Bonfante P.** 1996 An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3005–3010.

**Bonfante P, Anca IA.** 2009 Plants, Mycorrhizal Fungi and Bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63, 363-383.

**Bowen G, Rovira A.** 1991. The Rhizosphere: The hidden half of the hidden half. In: “Plant Roots: The hidden half”. (Y. Waisel A. Eshel and U. Kafkafi editores) Marcel Dekker, Inc. 641-649.

**Bowen G, Rovira A.** 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66, 1–102.

**Budi S, Tuinen D, Martinotti G, Gianinazzi S.** 1999. Isolation from the mycorrhizosphere of *Sorghum bicolor* of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soil-borne fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5148–5150.

**Buée M.** 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* 321, 189-212.

**Caron M .** 1989. Potential use of mycorrhizas in control of soil-born diseases. *Canadian Journal Plant Pathology*. 11, 177–179

**Cook JR, Baker KF.** 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. APS Press 539pp.

**Covacevich F, Echeverría HE, Andreoli YE.** 1995. Micorrización vesículo arbuscular espontánea en trigo en función de la disponibilidad de fósforo. *Ciencia del suelo* 13, 47-51.

**Fernández O, Vega L.** 2001. Microorganismos Antagonistas para el Control Fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* 62, 96-100.

**Fitter A y Garbaye J.** 1994. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil* 159, 123-132.

**Gemma J, Koske R, Roberts E, Jackson N.** 1997. Enhanced establishment of bentgrasses by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal for Applied Turfgrass Science*. 73, 9–14

**Giovannetti M, Mosse B.** 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular- arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84, 489-500.

**Guerra B.** 2008. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible 21, 121-201.

**Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD.** 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 2. Hyphal transport of <sup>32</sup>P over defined distances. *New Phytologist* 120, 509–516.

**Johansen A, Jakobsen I, Jenssen E.** 1994. Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. *Plant and Soil* 160, 1-9.

**Johansson F, Paul L, Finlay R.** 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 1-13.

**Kirk P, Cannon P, Minter D, Stalpers J.** 2008. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 10ma edición. CAB International, Wallingford

**Ko, W.** 1998. Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Pythium*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 39, 81-86.

**Krishnaraj P, Sreenivasa M.** 1992. Increased root colonization by bacteria due to inoculation of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus in chilli (*Capsicum annuum*). *Zentralblatt für Mikrobiologie* 147, 131–133.

**Lambers H, Mougél C, Jaillard B, Hinsinger P.** 2009. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil*. 321, 83-115.

**Larsen J, Cornejo P, Barea JM.** 2009. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. *Soil Biology and Biochemistry*. 41, 286-292.

**Larsen J, Ravnskov S, Jakobsen I.** 2003. Combined effect of an arbuscular mycorrhizal fungus and biocontrol bacterium against *Pythium ultimum* in soil. *Folia Geobotanica* 38, 145–154.

**Larsen J, Graham J, Cubero J, Ravnskov S.** 2011. Biocontrol traits of plants growth suppressive arbuscular mycorrhizal fungi against root rot in tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. *European Journal Plant Pathology* 1-9.

**Li B, Ravnskov S, Larsen J.** 2007. Biocontrol of *Pythium* damping-off in cucumber by arbuscular mycorrhiza-associated bacteria from the genus *Paenibacillus*. *Biocontrol* 52, 863-875.

**Linderman R.** 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: The mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78, 366–371.

**Linderman R** 1997. Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. In *The Mycota*. Carroll, G.C., and Tudzynski, P. (eds). Berlin, Germany: Springer-Verlag, 117–128.

**Mickelson S y Kaeppler M.** 2005. Evaluation of six mycorrhizal isolates for their ability to promote growth of maize genotypes under phosphorus deficiency. *Maydica* 50, 137–146.

**Morgan JA, Bending G, White P.** 2005. Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56, 1729–1739.

**Mullen J, Norton G, Reaves D.** 1997. Economic analysis of environmental benefits of integrated pest management. *Journal of Agricultural and Applied Economics*. 29, 243-253.

**Munkvold L, Kjoller R, Vestberg M, Rosendahl S, Jakobsen I.** 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytology* 164, 357–364.

**Owen-Going TN.** 2002. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in commercial-scale and small-scale hydroponic systems. , University of Guelph, Ontario.

**Owen-Going TN, Sutton JC, Grodzinski B.** 2003. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. Canadian Journal of Plant Pathology 25, 155-167.

**Paulitz T, Linderman R.** 1991. Mycorrhizal interactions with soil organism. In: Arora D, Rai B, Mukerji K, Knudsen G. Eds. Handbook of Applied Mycology, vol. 1 Soil and Plants. Marcel Dekker. New York, pp. 77-128.

**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.

**Raaijmakers J, Paulitz T, Steinberg C, Alabouvette, Moëne Y.** 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and Soil 329, 341-361.

**Ravnskov S, Jensen B, Knudsen I, Bodker L, Jensen D, Karlinski L, Larsen J.** 2006. Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. Soil Biology & Biochemistry 38, 3453–3462.

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

**Ryan PR, Dessaux Y, Thomashow LS, Weller DM.** 2009. Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. Plant and Soil.321, 363-383.

**Sánchez J, Goodman M.** 1992. Relationships among the mexican races of maize. *Economical Botany* 46, 72-85.

**Salazar J, Guevara A, Malda G, Rivera CH, Salinas Y.** 2009. Componentes de varianza de caracteres de maíz asociados al nixtamal. *Tecnociencia, Chihuahua*. 3, 74-83.

**Sasser M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: Clement, Z., Rudolph, K., Sands, DC (Eds.), *Methods in Phytobacteriology*. Akade´ miai Kiado´ , Budapest, pp. 199–204.

**Sylvia D, Hammond L, Bennett J, Haas J, Linda S.** 1993. Field response of maize to a VAM fungus and water manage- ment. *Agronomy J* 85,193–198

**St-Arnaud M, Hamel C, Caron M, Fortin JA.** 1994. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. *Canadian Journal Plant Pathology* 16, 187–194

**Thygsen , Larsen J, Bodker L.** 2004. Arbuscular myorrhizal fungi reduces development if pea root-rot caused by *Aphanomyces euteiches* using spores as pathogen inoculum. *European Journal of Plant Pathology* 110, 411-419.

**Ulacio D, Pérez C, Pineda J.** 1997. Microflora asociada a las raíces de las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) provenientes del estado portuguesa. *Bioagro*9, 3-11.

**Van de Plaats-Niterink, A. J. .** 1981. Monograph on the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*. 21, 1-242.

**Vázquez M, César S, Azcón R, y Barea 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, 261–272.

**Welc M, Ravnskov S, Kieliszewska-Rokicka B, Larsen J.** 2010. Suppression of other soil microorganisms by mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi root-free soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1-7

**Weller D, Cook R.** 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with *Fluorescent Pseudomonas*. *Phytopathology* 73, 463-469.

**Weller D, Raaijmakers J, Gardener B, Thomashow L.** 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40, 309–348.

**Whipps JM.** 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 487-511.

**Whipps JM.** 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82, 1198–1127.

**White DG.** 2004. Plagas y enfermedades del maíz. Ediciones Mundi-Prensa. 78 pp.

**Xavier L, Germida G.** 2003. Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil and Biochemistry* 35, 471-478.