



Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo
Programa Interinstitucional De Maestría En Ciencias Biológicas

Facultad De Biología

**“Efecto de la interacción entre
comunidades nativas de hongos
micorrízicos arbusculares y cepas del
género *Trichoderma* sobre el crecimiento y
nutrición del maíz”**

Tesis

Que Presenta:

IBT. Estefanía Saucedo Correa

Como requisito para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

Directora/ Co director de tesis:

Dra. Yazmín Carreón Abud

Dr. John Larsen

Morelia Michoacán, Junio de 2016





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

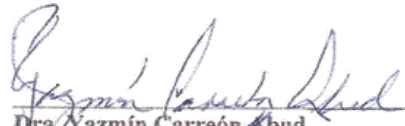
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Efecto de la interacción entre comunidades nativas de hongos micorrízicos arbusculares y cepas del género *Trichoderma* sobre el crecimiento y nutrición del maíz" presentado por la IBT. Estefanía Saucedo Correa, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

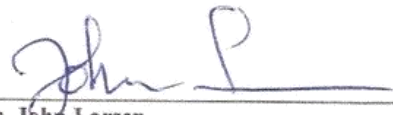
Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

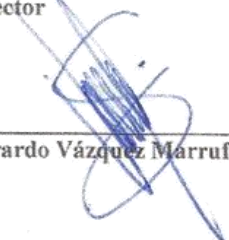
Morelia, Michoacán, a 16 de mayo de 2016

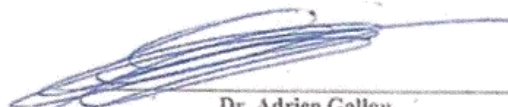
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Yazmín Carreón Abud
Directora de Tesis


Dr. John Larsen
Co director


Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno


Dr. Gerardo Vázquez Marrufo


Dr. Adrien Gallou

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Agroecología del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la Universidad Autónoma de México Campus Morelia, bajo la asesoría del Dr. John Larsen y la Dra. Yazmín Carreón Abud, con el apoyo de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgado a través de la Beca Nacional y Mixta.



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 de Agroecología del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad por las facilidades otorgadas para realizar los diversos experimentos descritos en esta tesis.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para realizar esta investigación, incluyendo la beca otorgada para realizar la estancia en el extranjero como parte de la formación profesional.

A mi asesora Yazmín Carreón Abud por su amabilidad y ayuda siempre presentes durante su asesoría.

A mi co asesor John por su siempre buen carisma y amabilidad para resolver las dudas que surgieron a lo largo del proceso de experimentación, por permitirme ser parte de su laboratorio y por promover siempre el buen compañerismo.

A los integrantes de mi comité, por sus valiosas aportaciones en cada evaluación las cuales enriquecieron mi trabajo

A mis compañeros de laboratorio que en algún momento me ayudaron a realizar parte de mi experimento, por su buena amistad y por compartir los buenos momentos.

A Daniel por su tiempo para ayudarme en los días más pesados de trabajo.

A Claudio por tomarse el tiempo de revisar mi escrito las veces necesarias y por sus aportaciones para mejorarlo.

A mis padres Mireya y Trinidad por su amor, su apoyo y por impulsarme a ser siempre una mejor persona.

A mi hermano German, que me ha inspirado a seguir sus pasos en el mundo de la ciencia.

A mis abuelos, por ser el ejemplo más grande de valentía y perseverancia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Interacción planta-suelo-microorganismo.....	3
2.2 Hongos Micorrízicos Arbusculares.....	4
2.2.1 Rol de los hongos micorrízicos arbusculares en la nutrición vegetal... 6	
2.2.2 Importancia de los HMA en el agroecosistema.....	7
2.3 Género <i>Trichoderma</i>	8
2.3.1 Aplicaciones de <i>Trichoderma</i>	9
2.4 Interacción HMA- <i>Trichoderma</i>	11
2.5 Maíz.....	13
3 HIPOTESIS.....	14
4 OBJETIVO GENERAL.....	14
4.1 Objetivos particulares.....	14
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Materiales Biológicos.....	15
5.1.1 Maíz.....	15
5.1.2 Inóculos micorrízicos.....	15
5.1.3 Cepas de <i>Trichoderma</i>	16
5.2 Prueba de viabilidad de las cepas de <i>Trichoderma</i>	16

5.3	Preparación del sustrato	16
5.4	Fases experimentales	17
5.4.1	Ensayo 1: Evaluación de la interacción en etapa presimbiótica	17
5.4.2	Ensayo 2: Evaluación de la interacción en etapa simbiótica	18
5.5	Estimación de la biomasa seca	19
5.6	Conteo de UFC's de <i>Trichoderma</i> en suelo	19
5.7	Tinción de raíces y porcentaje de colonización micorrízica.....	20
5.8	Extracción de ácidos grasos totales.....	21
5.9	Determinación del contenido de N y P en tejido vegetal	22
5.10	Análisis Estadístico	23
6	RESULTADOS	24
6.1	Ensayo 1: Evaluación de la interacción en etapa presimbiótica	24
6.1.1	Biomasa seca y porcentaje de colonización micorrízica.....	24
6.1.2	Densidad de <i>Trichoderma</i> (UFC/g).....	26
6.1.3	Ácidos grasos	29
6.2	Ensayo 2: Evaluación de la interacción en etapa simbiótica	32
6.2.1	Biomasa seca, porcentaje de colonización micorrízica y densidad de <i>Trichoderma</i>	32
6.2.2	Contenido de N y P en tejido vegetal.....	34
6.2.3	Ácidos grasos	35
7	DISCUSIÓN	40
7.1	Ensayo 1: Evaluación de la interacción en etapa pre simbiótica.	40
7.2	Ensayo 2: Evaluación de la interacción en etapa simbiótica.	43
8	CONCLUSIONES	46
9	REFERENCIAS	47
10	ANEXOS	58

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares
- Cuadro 2.** Diseño experimental.
- Cuadro 3.** Análisis de varianza de la biomasa seca aérea y radicular y porcentaje de colonización micorrízica. Ensayo 1 (E1).
- Cuadro 4.** Análisis de varianza de UFC/g de *Trichoderma* por muestreo (E1).
- Cuadro 5.** Análisis de varianza de ácidos grasos de los diferentes grupos de microorganismos del primer muestreo (E1).
- Cuadro 6.** Análisis de varianza de ácidos grasos de los diferentes grupos de microorganismos del último muestreo (E1).
- Cuadro 7.** Análisis de varianza de la biomasa seca aérea y radicular, porcentaje de colonización micorrízica y UFC de *Trichoderma*. Ensayo 2 (E2).
- Cuadro 8.** Análisis de varianza del contenido de N y P en tejido vegetal (E2).
- Cuadro 9.** Análisis de varianza de ácidos grasos de los diferentes grupos de microorganismos (E2).

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Aplicaciones e impacto de *Trichoderma*
- Figura 2.** Peso de biomasa seca y aérea (E1).
- Figura 3.** Porcentaje de colonización micorrízica (E1).
- Figura 4.** UFC de *Trichoderma* 14 días (E1).
- Figura 5.** UFC de *Trichoderma* 42 días (E1).
- Figura 6.** UFC de *Trichoderma* 56 días (E1).
- Figura 7.** UFC de *Trichoderma* 70 días (E1).
- Figura 8.** Perfil de ácidos grasos de actinomicetos (E1).
- Figura 9.** Perfil de ácidos grasos totales y HMA (E1).
- Figura 10.** Biomasa seca aérea y radicular (E2).
- Figura 11.** Porcentaje de colonización micorrízica (E2).
- Figura 12.** UFC de *Trichoderma* (E2).
- Figura 13.** Contenido de N en tejido vegetal.
- Figura 14.** Contenido de P en tejido vegetal.
- Figura 15.** Perfil de ácidos grasos de bacterias Gram (+) y Gram (-) (E2).
- Figura 16.** Perfil de ácidos grasos de actinomicetos (E2).
- Figura 17.** Perfil de ácidos grasos de hongos totales y HMA (E2).

RESUMEN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y *Trichoderma* son microorganismos que comúnmente habitan en la rizosfera cuya combinación ha sido reportada en algunos estudios como un efecto sinérgico evidenciando un aumento en el rendimiento vegetal como también generando un aumento en la colonización micorrízica y en la densidad de *Trichoderma* en el suelo. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la interacción de tres comunidades nativas de hongos micorrízicos arbusculares con cepas de hongos pertenecientes al género *Trichoderma* y su efecto sobre el crecimiento y nutrición de plantas de maíz. Se realizaron dos experimentos, el primero con la finalidad de evaluar la interacción en una etapa pre-simbiótica de los HMA y el segundo con el propósito de evaluar la interacción una vez establecida la simbiosis. En suelo estéril las plantas de maíz híbrido DK-2061 e híbrido H-565 fueron inoculadas con el suelo de las comunidades nativas de HMA y en diferentes tiempos se adicionó una suspensión de conidios de *Trichoderma* a los tratamientos requeridos a una densidad de 1×10^6 conidios/g de suelo. Se evaluó biomasa, colonización, UFC de *Trichoderma* en suelo, contenido de P/N y ácidos grasos en suelo. La colonización micorrízica no fue afectada por la presencia de *Trichoderma* mientras que la densidad de *T. harzianum* y *T. viride* en el suelo se vio reducida en presencia de las comunidades nativas de HMA. El análisis de ácidos grasos en suelo mostró un aumento de diferentes comunidades de microorganismos (actinomicetos, bacterias Gram positivo y Gram negativo) en los tratamientos que contenían *Trichoderma* y HMA en combinación. El crecimiento vegetal fue influenciado por las diferentes comunidades nativas de HMA en función del genotipo de maíz. La interacción de ambos microorganismos ejerció un efecto neutral sobre la biomasa de las plantas y sobre la colonización micorrízica. Los resultados obtenidos sugieren que los efectos de la interacción de ambos microorganismos dependen tanto de los genotipos fúngicos como de la planta hospedera.

Palabras clave: HMA, *Trichoderma*, nutrición vegetal, rizosfera.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and *Trichoderma* are common microorganisms in the rhizosphere and their combination has been reported showing in some investigations an enhancement on plant growth as well as increase mycorrhizal colonization and *Trichoderma* density in soil. The aim of this work was to evaluate the interaction between three native AMF communities with three strains of *Trichoderma* and their effect on growth and nutrition of maize plants. Two experiments were carried out. The first one with the purpose of testing the interaction established on the pre-symbiotic stage and the second experiment with the objective to evaluate the interaction in a symbiotic stage of AMF.

Maize hybrid plants (DK-2061 and H-565) were grown in sterile soil and inoculated with native AMF communities. *Trichoderma* strains were inoculated in different time by adding a density of 1×10^6 conidia g^{-1} of soil. Dry biomass, arbuscular mycorrhizal colonization, *Trichoderma* colony forming units (CFU), P and N content and whole cell fatty acid (WCFA) were determined. Arbuscular mycorrhizal colonization was not affected by *Trichoderma* strains, whereas CFU of *T. harzianum* and *T. viride* in soil were decreased by native AMF communities. The WCFA analysis showed an increase in different microorganism communities such as actinomycetes, bacteria (Gram positives and negatives) by the combination of AMF and *Trichoderma* strains. Plant growth was influenced by the different native AMF communities depending on maize genotype. A neutral effect on plant biomass and arbuscular mycorrhizal colonization was observed during fungal interactions. The results suggest that the effects of the interaction depend of fungal genotypes and host plant.

1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos del suelo constituyen un papel importante en el ciclo biogeoquímico de nutrientes y materia orgánica, así como en el mantenimiento de la calidad del suelo. La actividad microbiana en la rizosfera es un factor que influye sobre la disponibilidad de nutrientes para las plantas y genera un efecto directo sobre su salud y productividad (Barea *et al.* 2013). Esta actividad se ve afectada por las constantes interacciones entre los microorganismos, el suelo y las plantas, las cuales resultan ser complejas en base a sus relaciones mutualistas, parásitas o patógenas (Newton *et al.* 2010). Dentro de los microorganismos rizosféricos unos de los más estudiados han sido los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) los cuales se encuentran presentes en la mayoría de los ecosistemas terrestres y forman asociaciones simbióticas con las raíces de más del 80% de las plantas vasculares (Smith y Read, 2008). Los HMA otorgan diferentes beneficios a su planta hospedera entre ellos una mejor absorción de fósforo, aumento de la tolerancia a estrés biótico y abiótico, reducción de la incidencia de enfermedades de la raíz (Azcón *et al.* 2002; Smith y Read, 2008; Cavagnaro 2008). Otro grupo de microorganismos benéficos en la rizosfera son los hongos pertenecientes al género *Trichoderma*, entre los cuales, *Trichoderma* spp. ha sido descrito como agente de control biológico debido a la producción de compuestos antimicrobianos y por su capacidad de parasitismo de hongos fitopatógenos. En base a la productividad y salud de las plantas, HMA y *Trichoderma* spp. han demostrado mejorar estos aspectos (Harman *et al.* 2004, Avis *et al.* 2008) y su combinación ha sido reportada en diferentes estudios con resultados contrastantes. Se han reportado evidencias de un efecto positivo debido a la inoculación dual sobre el rendimiento de las plantas ya sea en presencia o ausencia de patógenos (Datnoff *et al.* 1995; Martínez-Medina *et al.* 2011). Sin embargo, efectos como la disminución de la colonización micorrízica por parte de cepas de *Trichoderma*, así como reducción de la densidad de *Trichoderma* en suelo por efecto de los HMA han sido observados (Martínez *et al.* 2004; Chandanie *et al.* 2009). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la interacción entre comunidades

nativas de hongos micorrízicos y diferentes especies del género *Trichoderma* y el efecto que tiene sobre el crecimiento y la nutrición de plantas de maíz.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Interacción planta-suelo-microorganismo

En la naturaleza existe una amplia gama de interacciones que suceden de manera simultánea entre distintos organismos y que son indispensables para mantener el equilibrio de los ecosistemas. En el suelo, se llevan a cabo múltiples actividades que son vitales para los organismos que dependen de él, como las plantas y la microbiota. En este sentido, la rizosfera (zona de transición entre el suelo y la superficie de las raíces) es un sitio donde se alberga una gran diversidad de comunidades microbianas incluyendo especies saprófitas, epífitas, endófitas, patógenas y microorganismos benéficos como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores (Avis *et al.* 2008; Cano, 2011). Por otro lado, las raíces de las plantas liberan dentro de la rizosfera diversos compuestos químicos, algunos de bajo peso molecular como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y otros compuestos como mucílago o proteínas (Bais *et al.* 2006), metabolitos ante los cuales los microorganismos reaccionan ya que proveen un adecuado nicho ecológico para su crecimiento. Viceversa, los microorganismos y sus productos interactúan con las raíces lo cual se refleja en el crecimiento de las plantas, en la resistencia y/o susceptibilidad frente estrés abiótico y enfermedades (Morgan *et al.* 2005). Las interacciones a nivel rizosféricos son complejas y están altamente influenciadas por factores edáficos y por la diversidad de especies que participan, además de las propiedades fisicoquímicas del suelo (Bais *et al.* 2004). Algunos grupos de microorganismos mantienen relaciones más estrechas con las plantas y el ambiente donde se desarrollan como es el caso de los HMA los cuales por sus características biológicas necesitan asociarse a las raíces para completar su ciclo de vida, obtener e intercambiar nutrientes y energía manteniendo una interacción constante y necesaria con su planta hospedera. Otros hongos y bacterias en la rizosfera interactúan con las raíces y aportan beneficios a las plantas. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) son grupos de bacterias que habitan en la rizosfera y pueden colonizar alrededor de

las raíces y aprovechar los exudados liberados por las especies vegetales. El principal rol de las PGPR es la promoción del crecimiento vegetal a través de la liberación de hormonas, fijando N o actuando como agente de control biológico (Hayat *et al.* 2010). Algunos hongos rizosféricos de vida libre como *Trichoderma* ha demostrado actuar como un efectivo agente de control biológico de enfermedades en las raíces de plantas, y puede hacerlo a través de diversos mecanismos, como antagonista de hongos patógenos a través de liberación de sustancias antibióticas, mediante la competencia por espacio o por medio del aumento de la toma de nutrientes ya que *Trichoderma* ha demostrado inducir el crecimiento de raíces y la bioma aérea, aumentar la tasa de germinación de semillas incluso aumentar la capacidad fotosintética (Harman 2004; Sorech *et al.* 2010).

2.2 Hongos Micorrízicos Arbusculares

Los hongos micorrízicos arbusculares pertenecen al phylum Glomeromycota (Cuadro 1), son organismos biotrofos obligados que viven en simbiosis con las raíces de más del 80% de las plantas vasculares (Smith *et al.* 2003). El término arbuscular se deriva de sus estructuras situadas al interior de la raíz denominadas arbusculos los cuales se forman en las células corticales de las raíces a partir de hifas ramificadas y son considerados el sitio de intercambio de nutrientes (Smith y Read, 2008). Dentro de la raíz, los HMA forman otras estructuras llamadas vesículas, que contienen lípidos y se consideran elementos para la reproducción y como la fuente energética de reserva (Mosse, 1973). Algunos géneros de HMA como *Scutellospora* y *Gigaspora* no producen vesículas, pero forman unas estructuras llamadas células auxiliares. Fuera de la raíz los HMA forman una extensa red de micelio externo que tiene como función explorar el suelo o sustrato más allá de los alcances de la raíz y transportar hasta el interior nutrientes minerales poco solubles en especial fosfatos y amonio (Barea *et al.* 2005).

El desarrollo de los hongos micorrízicos comienza con la formación de esporas las cuales llegan a medir hasta 500 μm de diámetro y están compuesta

principalmente de lípidos y carbohidratos, poseen una pared celular muy resistente debido a la presencia de quitina y en algunos casos a su contenido de β (1–3) glucano (Gianinazzi *et al.* 1994; Lemoine *et al.* 1995). Cuando la espora germina, utiliza sus reservas de lípidos para que comience la formación de hifas siempre y cuando existan señales moleculares por parte de la raíz que le permita estimular la ramificación de las hifas, lo que da lugar a la etapa pre simbiótica (Giovannetti *et al.* 1993; Buée *et al.* 2000). El proceso de colonización ocurre cuando la hifa penetra y se desarrolla en la zona intersticial de las células corticales de la raíz (colonización tipo *Arum*), donde dará paso a la formación de arbusculos vesículas e hifas intraradicales, y cuando se desarrolla en el espacio intracelular (colonización tipo *París*) dará lugar a la formación de hifas y coils mientras que al exterior de la raíz se desarrollará micelio extraradical y esporas. (Allen 1996; Dickson 2004).

Cuadro 1: Clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares (Redecker *et al.* 2013; Schüßler y Walker 2010).

<i>Phylum</i>	<i>Orden</i>	<i>Familia</i>	<i>Género</i>
<i>Glomeromicota</i>	Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i> <i>Dominikia</i> <i>Funneliformis</i> ¹ <i>Kamienskia</i> <i>Rhizophagus</i> ² <i>Sclerocystis</i> ³ <i>Septoglomus</i>
		Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i> ⁴
	Diversisporales	Gigasporaceae	<i>Cetraspora</i> <i>Dentiscutata</i> <i>Gigaspora</i> <i>Intraornatospora</i> ⁵ <i>Paradentiscutata</i> ⁵ <i>Racocetra</i> <i>Scutellospora</i>
		Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> ⁶
		Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
		Diversisporaceae	<i>Corymbiglomus</i> ⁵ <i>Diversispora</i> ⁷ <i>Otospora</i> ⁵ <i>Redeckera</i> <i>Tricispora</i> ⁵

Phylum Glomeromycota	Orden	Familia	Género
	Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
	Archaeosporales	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
		Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>
		Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i> ⁸

1. Antiguo Glomus Grupo Aa, "clado *Glomus mosseae*". 2. Antiguo Glomus Grupo Ab, "clado Glomus intraradices". 3. Basal en el antiguo Glomus grupo Ab. 4. Antiguo Glomus grupo B, "clado *Glomus claroideum*". 5. Pruebas insuficientes para su clasificación, pero no se han tomado medidas formales. 6. Incluye antiguo *Kuklospora*. 7. Antiguo Glomus grupo C. 8. Incluye el antiguo *Intraspora*.

2.2.1 Rol de los hongos micorrízicos arbusculares en la nutrición vegetal

Un problema habitual en la agricultura es los escasos de nutrientes en el suelo, siendo el fósforo (P) principalmente el factor más limitante. Se estima que entre el 30 y 40% de los suelos arables en el mundo tiene deficiencia de P, lo cual disminuye el rendimiento en la producción agrícola (Barea *et al.* 2008). En este sentido, las plantas cuentan con diversos mecanismos para hacer frente a la deficiencia de P, uno de ellos es través de la conservación de su uso, por ejemplo, reduciendo la tasa de crecimiento, modificando el metabolismo del carbono que incluyan el uso de P y/o modificando la biosíntesis de las membranas para utilizar menos P (Vance 2008). Otro mecanismo desarrollado por las plantas está enfocado hacia la adquisición y eficiencia en la toma de este elemento, a través de la modificación de la arquitectura de la raíz, aumentando el desarrollo de pelos radicales o bien aumentado la producción y exudación de ácidos orgánicos (Lopez-Bucio *et al.* 2002; Shane y Lambers, 2005).

El rol de los HMA en relación al aumento de la nutrición vegetal y en especial en la absorción de fósforo, ha sido ampliamente reportada (Smith y Read, 2008; Richardson *et al.* 2011; Gianinazzi *et al.* 2010; Cavagnaro *et al.* 2012). El descubrimiento de fósiles de plantas revela la existencia de asociaciones micorrízicas hace más de 400 millones de años atrás (Kenrick 2003), por lo cual se considerará que las plantas han co-evolucionado con los hongos micorrízicos, considerándose que el establecimiento de la micorriza arbuscular ha sido una las

adaptaciones más importantes de las plantas como mecanismo para hacer frente a la baja disponibilidad de P en ecosistemas naturales (Barea *et al.* 2008). De manera general la planta hospedera recibe nutrientes minerales a través del micelio del HMA (micotrofismo) mientras que el hongo recibe los compuestos producto de la fotosíntesis. El hongo micorrízico, al igual que las raíces de las plantas toma el fósforo inorgánico (Pi) del suelo, pero el micelio del hongo micorrízico es más eficiente que las raíces. Esta función está relacionada con la liberación de exudados por parte del micelio del hongo micorrízico que son capaces de solubilizar el P más eficientemente en comparación con los exudados de la raíz (Tawarayama *et al.* 2006). Esta capacidad de solubilización se ha relacionado con la liberación de iones H⁺ o mediante la producción de hidroxiácidos con actividad quelante (Bago y Azcón-Aguilar, 1997). Otro mecanismo por el cual los HMA favorecen la adquisición de P es debido a la amplia red de micelio extraradical que puede extenderse hacia zonas imposibles de alcanzar para las raíces, de manera que a través del micelio se absorbe y transloca el Pi hasta la planta (Jakobsen *et al.* 1992). Además del P, los HMA han mostrado aumentar la capacidad de las plantas para adquirir N de fuentes inorgánicas (Cavagnaro, 2008). Las evidencias muestran que los hongos micorrízicos exploran reservorios de nitrógeno en el suelo facilitando su movilidad hacia la planta hospedera (Hodge y Fitter, 2010). Además de macronutrientes los HMA han mostrado mejorar la asimilación de otros elementos de baja movilidad en el suelo como Zn, Cu o Fe (Liu *et al.* 2000).

2.2.2 Importancia de los HMA en el agroecosistema

La asociación micorrízica arbuscular se considera un elemento importante que contribuye a aumentar la productividad de los cultivos, no solo en un aspecto nutricional, ya que también ha demostrado contribuir a la formación de agregados del suelo, evitar la erosión y aliviar el estrés en las plantas causado por factores bióticos y abióticos (Gianinazzi *et al.* 2010). La extensa red de micelio extraradical favorece la agregación de la estructura del suelo, esta acción se debe a la

liberación de sustancias proteicas con características hidrofóbicas referido como glicoproteínas cuya función consiste en adherir las partículas y contribuir a mantener a la estabilidad del suelo y a aumentar la retención de agua (Rilling *et al.* 2002; Bedini *et al.* 2009). Por otra parte, los HMA mejoran la tolerancia de las plantas cuando se encuentran sometidas a diversos tipos de estrés, por ejemplo, aumentan la resistencia a condiciones de sequía mejorando la captación de agua a través del micelio o mediante un ajuste osmótico que le permite a la planta evitar o atenuar la pérdida de agua (Auge, 2001). En suelos contaminados con metales pesados los HMA brindan una mayor tolerancia a las plantas a través de diversos mecanismos entre los cuales destacan la inmovilización de metales pesados mediante la secreción de sustancias quelantes, enlace de los metales pesados al biopolímero de la pared celular de los HMA (quitina, glomalina), quelación intracelular por metalotioneínas, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc. (Cornejo *et al.* 2008). Por ejemplo, en plantas de maíz micorrizadas un aumento en la biomasa y una disminución en las concentraciones de Cd, Cu y Mn tanto en raíces como en la parte aérea se ha observado (Weissenhorn *et al.* 1995). En otro sentido, numerosos estudios han demostrado el efecto benéfico de los HMA al aumentar la tolerancia al estrés biótico causado por fitopatógenos. Se ha demostrado su efectividad como agente de control biológico contra patógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Phytlum* (Harrier y Watson 2004). De acuerdo a lo anterior, los HMA constituyen un elemento importante para lograr una agricultura sustentable debido a su potencial uso como complemento de las actividades agrícolas que ayude a reducir la aplicación de fertilizantes y como auxiliares en el manejo de enfermedades producidas por fitopatógenos.

2.3 Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* (Telemorfo *Hypocrea*) agrupa una amplia diversidad de hongos que se encuentran presentes en diferentes ecosistemas. Es un habitante natural del suelo y se caracteriza por tener un estilo de vida muy versátil debido a sus hábitos nutricionales: saprófito y biotrofo (Atanasova, 2014).

Pertenece al Phylum Ascomycota, orden Hypocreales, familia Hypocreaceae y abarca más de 327 especies reportadas hasta el momento (NCBI; Mycobank). Generalmente las colonias de *Trichoderma* desarrollan un micelio blanco y algodonoso al inicio de su crecimiento. Las hifas son hialinas y tabicadas, a medida que crecen se entrelazan para formar una red. La identificación de género con base en la morfología se hace mediante estructuras especializadas de fructificación llamadas conidióforos, los que generalmente son cortos y ramificados de manera piramidal, terminan en fiálides, en donde se forman las esporas asexuales (conidios). Los conidios son de 1 µm a 2 µm de diámetro, de esféricos a elípticos y forman cúmulos compactos unidos por una secreción mucilaginoso (Kubicek y Harman, 1998). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, estas son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda prevalecer a través del tiempo siendo capaces de tolerar condiciones ambientales adversas. Las clamidosporas tienden a ser de globosas a subglobosas, terminales o intercalares de tono verde y menores a 15 µm de diámetro (Samuels, 1996). Por lo tanto, las especies del género *Trichoderma* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (Infante *et al.* 2009), lo cual hace de las especies de este género un tipo de organismo cosmopolita en los diversos ecosistemas.

2.3.1 Aplicaciones de *Trichoderma*

Trichoderma interactúa con las especies vegetales no estrictamente de forma simbiótica a diferencia de los hongos micorrízicos, sin embargo, está ampliamente documentado los efectos positivos que causa sobre las plantas y sus aplicaciones en otras áreas (Figura 1). Las especies de este género han sido utilizadas principalmente como agente de control biológico ya que produce gran cantidad de sustancias que inhiben o degradan pectinasas y otras enzimas que son esenciales para el desarrollo de hongos fitopatógenos (Mukherjee *et al.* 2013; Benítez *et al.* 1998). Para hacer frente a las enfermedades que estos hongos

producen en las plantas, *Trichoderma* cuenta con diversos mecanismos, uno de ellos es a través del micoparasitismo capacidad que le permite parasitar a otros hongos mediante la liberación de enzimas (exoquitinasa y endoquitinasas) que degradan la pared celular. Este fenómeno de lleva a cabo cuando *Trichoderma* entra en contacto con el hongo blanco, sus hifas se enrollan alrededor y forman un apresorio, produciendo gran cantidad de sustancias (enzimas, antibióticos y peptaiboles) que provocan la destrucción total de la pared celular del hongo blanco (Harman, 2004; Brunner *et al.* 2006; Schirmböck *et al.* 1994).

Además de su efecto como agente de control biológico, *Trichoderma* ha demostrado aumentar el crecimiento vegetal (radicular y parte aérea) gracias al aumento de la producción de fitohormonas, metabolitos secundarios y compuestos volátiles (auxinas, harzianolide, 6-pentil-a-pirona) (Vinale *et al.* 2008; Lorito *et al.* 2010; Siddique, 2013). Algunos estudios sugieren también que este efecto promotor de crecimiento se debe a que *Trichoderma* aumenta la solubilización de nutrientes minerales incluso en situaciones de estrés (Mastouri *et al.* 2010). Algunas especies de *Trichoderma* también han sido utilizado en procesos de biorremediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos, incluido metales pesados tanto de suelo como de agua (Harman *et al.* 2004b). En adición a las aplicaciones ya mencionadas, *Trichoderma* ha sido usado también en el sector industrial gracias a la producción de enzimas utilizadas en el área alimenticia, área textil (producción de pigmentos) y el área farmacéutica gracias a la producción de metabolitos secundarios de importancia clínica y la producción de proteínas heterólogas importantes en el área médica (Mukherjee *et al.* 2013).

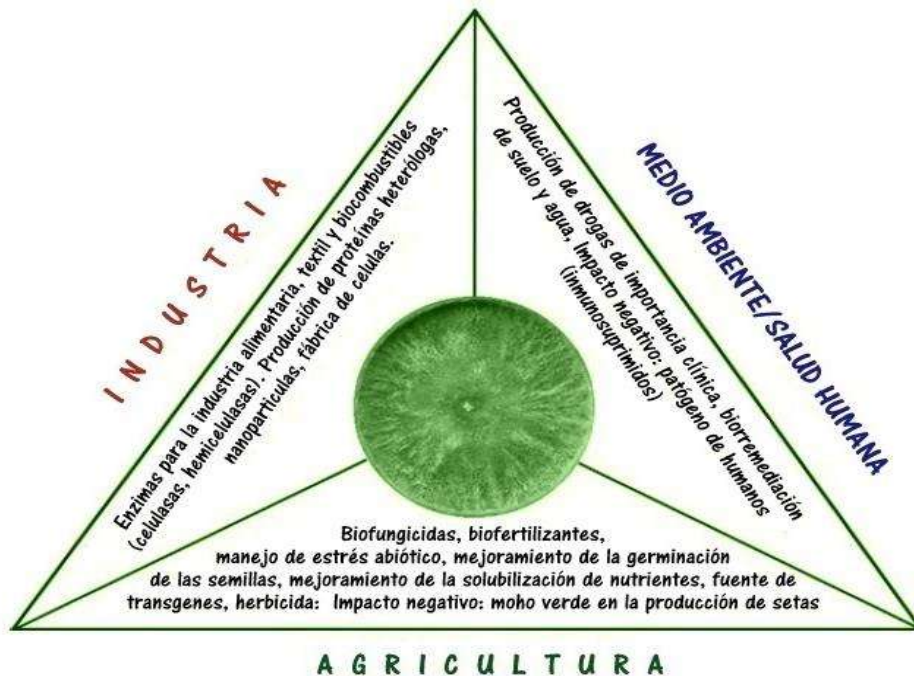


Figura 1. Aplicaciones e Impacto de *Trichoderma* (Modificado de Mukherjee *et al.* 2013).

2.4 Interacción HMA-*Trichoderma*

Tanto *Trichoderma* como los HMA se encuentran presentes en sistemas naturales y en sistemas agrícolas. Considerando el impacto de ambos microorganismos para la productividad de la planta, reviste de gran importancia estudiar la interacción de ambos hongos en la rizosfera, sin embargo, debido a la dificultad para reproducir a los HMA *in vitro* hace que esta interacción sea poco estudiada. Algunos estudios sugieren que existe un sinergismo entre hongos micorrízicos y *Trichoderma* mientras que en otros se ha observado un ataque por parte de *Trichoderma* hacia los HMA suprimiendo la colonización en las raíces. Por otra parte, una reducción en la densidad poblaciones de *Trichoderma* ha sido observada debido a la presencia de HMA (Green *et al.* 1999; Chandanie *et al.* 2009; Martínez-Medina *et al.* 2009). Otros estudios también se han enfocado en el efecto de la interacción de estos dos hongos sobre la eficacia para el control biológico. Datnoff *et al.* (1995) observó que la inoculación con *Glomus intrarradices* y *Trichoderma harzianum* (inóculos comerciales) sobre plantas de tomate reduce la incidencia y la severidad de la pudrición de raíces causada por

Fusarium en condiciones de campo. Del mismo modo, la doble inoculación de *G. mosseae* y *T. harzianum* redujo la pudrición de la raíz causada por *Fusarium solani* y *Macrophomina phaseolina* en suelos artificialmente o naturalmente infestados (Haggag y Faten, 2001). En un estudio realizado por Fillion *et al.* (1999) bajo condiciones *in vitro* se evaluó la interacción entre HMA y microorganismos de la rizosfera, cuyos resultados indicaron que tanto el crecimiento de *Pseudomonas chlororaphis* y la germinación de los conidios de *T. harzianum* fueron estimulados en presencia de extractos de HMA. En contraste, la germinación de los conidios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* se redujo, mientras que el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* no se vio afectada.

En base a la colonización micorrízica, Martínez-Medina *et al.* (2011) observaron un efecto sinérgico sobre la colonización en raíces de *Glomus constrictum* y *G. intraradices* debido a la interacción con *T. harzianum* bajo una fertilización reducida y además evidenciaron que la combinación HMA-*Trichoderma* fue más efectiva para controlar *Fusarium* que aplicar solo HMA, sin embargo, fue muy similar a solo aplicar *Trichoderma*.

En otro estudio realizado por Sosa-Rodríguez *et al.* (2005) observaron que la presencia de *T. harzianum* disminuyó la colonización radicular por HMA, aunque no afectó la cantidad de esporas de HMA/g suelo seco, en tanto que la población de *T. harzianum* (UFC/g suelo seco) disminuyó significativamente en presencia de HMA. Estos resultados reflejaron que existen interacciones entre HMA y *T. harzianum* que afectan tanto el desarrollo de HMA como la densidad de *T. harzianum*. Sin embargo, los valores obtenidos en base al crecimiento de la planta sugieren que el efecto de la interacción entre los microorganismos es de tipo neutral. Vázquez *et al.* (2000) realizaron un estudio sobre la influencia de diferentes inoculantes microbianos entre ellos *Trichoderma* sobre la colonización de distintos HMA (*G. mosseae*, *G. deserticola* y una población nativa) en raíces de maíz en las cuales la colonización de HMA no se vio afectada por la presencia de inoculantes microbianos, sin embargo el éxito de la colonización depende del HMA, siendo en este estudio *G. deserticola* quien presentó mayor colonización comparada con la población nativa.

2.5 Maíz

El maíz (*Zea mays*) es una de los granos alimenticios más importante a nivel mundial. Pertenece a la familia Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género (FAO, 2001). El maíz, es el único cereal que puede ser usado como alimento en distintas etapas del desarrollo de la planta. Las espigas jóvenes del maíz cosechado antes de la floración de la planta son usadas como hortaliza. Las mazorcas tiernas de maíz dulce se utilizan para preparar diversos platillos. Las mazorcas verdes de maíz común también son usadas en gran escala, asadas o hervidas, o consumidas en el estado de pasta blanda en numerosos países. Se utiliza también en la medicina tradicional, en la industria el maíz es utilizado para elaborar variada cantidad de productos como tortillas, harinas de maíz, masa, varios bocadillos, cereales para el desayuno, espesantes, pastas, jarabes, endulzantes, aceite de maíz, bebidas sin alcohol, cerveza y wiski, alimentos humanos o para los animales domésticos y productos industriales. Los olotes del maíz y los restos de tallos secos no contienen almidón y no tienen mayor valor alimenticio, pero contienen celulosa y son una fuente potencial para la producción de etanol, técnicas ahora disponibles a través de la biotecnología y de la ingeniería genética que pueden contribuir a revolucionar la producción de combustibles (FAO, 2001).

En México se considera el cultivo más importante desde el punto alimentario, económico y político, pues cubre aproximadamente la mitad de la superficie agrícola sembrada con 7.42 millones de hectáreas y una producción anual de 23.27 millones de toneladas (SIAP, 2014), principalmente en las zonas sub-húmeda tropical, templada húmeda y sub-húmeda (Fernández *et al.* 2013). De la superficie total sembrada con maíz, la mayor parte (80 %) es de temporal. La mayoría de la superficie sembrada corresponde a maíces nativos, sin embargo, el 20 % del maíz que se produce corresponde variadas híbridas o mejoradas y mayormente cultivadas en parcelas de riego (SIAP, 2011). Estas variedades mejoradas han demostrado tener un mayor rendimiento y muestran ser notablemente superior a la nativa pues tienen mayor capacidad de adaptación y estabilidad a la variabilidad climática (Turrent *et al.* 2012).

3 HIPOTESIS

La interacción entre comunidades nativas de HMA y *Trichoderma* genera un efecto sobre el crecimiento y la nutrición del maíz dependiendo de los genotipos fúngicos y el ciclo de vida de los HMA.

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos que genera la interacción de diversas comunidades nativas de HMA y diferentes cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento y la nutrición del maíz.

4.1 Objetivos particulares

Evaluar el efecto que ejercen cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* y un inóculo comercial a base de conidios de *T. harzianum*) sobre el desarrollo de comunidades nativas de HMA.

Evaluar el efecto de diferentes comunidades nativas de HMA sobre la densidad de cepas de *Trichoderma* en el suelo.

Evaluar el efecto que causa la interacción de HMA nativos y *Trichoderma* sobre el crecimiento y nutrición del maíz.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales Biológicos

5.1.1 Maíz

Se utilizaron dos variedades de maíz en los ensayos realizados en este trabajo. En el primer ensayo se utilizó el híbrido H-565 producido por la empresa Semillas Barriga SPR®, la cual es utilizada en diferentes localidades del estado de Michoacán. Es un híbrido de porte intermedio a alto, con un potencial de rendimiento mayor a 10 toneladas por hectárea y con alta calidad de grano para la elaboración de tortillas con el método tradicional. Tiene un ciclo fenológico de 130 a 135 días y una altura de planta de 280 a 290 cm.

Para el segundo ensayo se utilizó variedad de maíz híbrido DK-2061 producido por la empresa DEKALB® y es utilizado en las regiones del Bajío de México. Es un híbrido de porte medio con hojas semierectas con buena cobertura de mazorca y grano semidentado. Tiene un ciclo fenológico de 175 a 180 días y una altura de planta de 245 a 265 cm, bajo condiciones de riego es ideal para sembrar entre los meses de abril a junio.

5.1.2 Inóculos micorrízicos

Se utilizaron tres inóculos de hongos micorrízicos nativos procedentes de suelo agrícola de tres estados de la República Mexicana: Guanajuato, Michoacán y Edo. De México. Cada inóculo original fue obtenido de suelo donde se cultiva maíz bajo diferentes sistemas de producción que corresponde a intensivo (Guanajuato), intermedio (Michoacán) y tradicional (Edo. de México). Con la finalidad de obtener un inóculo viable se utilizaron cultivos trampa para la propagación de los HMA nativos utilizando plantas de maíz. El suelo rizosféricos de estos cultivos trampa fue el utilizado en los ensayos realizados.

(Nota: la propagación de los inóculos, así como la identificación de los HMA pertenece a un trabajo de tesis de maestría realizado por la M.C. Mónica Herrejón. Ver anexo 1).

5.1.3 Cepas de *Trichoderma*

Se utilizaron tres diferentes cepas de *Trichoderma*: *T. viride* cp. 56, *T. harzianum* cp. 38 y *T. harzianum* inóculo comercial. El inóculo comercial de *T. harzianum* es distribuido por la empresa COSUSTENTA S.A de C.V. *T. viride* cp. 56 y *T. harzianum* cp. 38 pertenecen a una colección de cepas del Colegio de Postgraduados (COLPOS). Ambas cepas fueron aisladas de suelos de diferentes usos agrícolas y forestales (Ibarra-Medina *et al.* 2010).

5.2 Prueba de viabilidad de las cepas de *Trichoderma*

Se determinó la viabilidad (porcentaje de germinación) de las tres cepas usadas en ambos ensayos. De cultivos puros de cada cepa de *Trichoderma* se obtuvo una suspensión de conidios agregando 10 ml de agua desionizada estéril con dispersante (Tritón al 0.01%) y raspando la superficie de la caja con una aza estéril. Cada suspensión de conidios fue colectada en tubos de vidrio estériles. Posteriormente, en cajas con medio agar dextrosa y papa (PDA) se inocularon 100 µl de la suspensión dispersando con técnica de extensión en placa (tres repeticiones por cada cepa). Las cajas fueron incubadas a 27°C durante 16 horas. Por cada repetición se cortó un fragmento de aproximadamente 3 x 1 cm de ancho. Este fragmento se colocó en un portaobjetos y se llevó al microscópico para contar 300 conidios/fragmento, contando en total 900 conidios/cepa de *Trichoderma* y se contabilizó conidios germinados y no germinados.

5.3 Preparación del sustrato

Se preparó una mezcla de suelo y arena de río en proporción 1:1 (p/p). El suelo fue obtenido de una parcela de estudio perteneciente al Centro Regional Universitario Centro Occidente (CRUCO) de la Universidad de Chapingo Campus Morelia. El suelo es de tipo arcilloso con un pH de 7.28, con capacidad de campo de 37.5 %, de bajo contenido de fósforo (5.80 ppm) y materia orgánica (2.74 %) (Ver Anexo 2). El sustrato fue esterilizado en autoclave a 15 libras de presión a

una temperatura de 121° C durante una hora. El procedimiento se repitió dejando un lapso de 48 horas entre la primera y la segunda esterilización.

5.4 Fases experimentales

5.4.1 Ensayo 1: Evaluación de la interacción en etapa pre-simbiótica

Esta fase tuvo como finalidad evaluar la interacción entre *Trichoderma* y las comunidades nativas de hongos micorrízicos en etapa pre-simbiótica, ya que al inicio del experimento solo fueron aplicados los inóculos nativos de HMA y la suspensión de conidios en ausencia de planta (periodo de incubación). Para ello 800 g de sustrato fueron colocados en macetas con capacidad de 1L, 80 g de suelo de las comunidades nativas de HMA fueron inoculados en los tratamientos requeridos. Las cepas de *Trichoderma* fueron aplicadas a una densidad de 1×10^6 conidios/g de suelo. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones dando un total de 80 unidades experimentales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diseño experimental

Factor	Niveles
HMA (Comunidades nativas)	Guanajuato Michoacán Edo. De México Control
<i>Trichoderma</i>	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i> Tricsoil Control
4 HMA *4 Trichoderma =	16 tratamientos
* 5 repeticiones =	80 UE

El suelo fue fertilizado antes de la aplicación de los tratamientos (Ver Anexo 3) y cada dos semanas se adicionaban únicamente 3 ml de nitrato de amonio. Cabe destacar que a ningún tratamiento se le adicionó P. Las macetas fueron regadas al 80 % de su capacidad de campo cada tercer día. Se mantuvieron en periodo de incubación durante 14 días en condiciones de invernadero. Transcurridas las dos semanas se sustrajeron 10 g de suelo de cada unidad experimental para determinar las UFC de *Trichoderma* y cuantificar la densidad de HMA mediante la técnica de ácidos grasos. Al término del periodo de incubación en cada maceta fueron sembradas tres semillas de maíz de las cuales dos fueron eliminadas después de haber germinado considerando mantener la homogeneidad en el tamaño. Las plantas fueron regadas periódicamente manteniendo el suelo a un 80% de su capacidad de campo. A las 4, 6 y 8 semanas después del periodo de incubación (42, 56 y 70 días después de la inoculación con *Trichoderma*) se tomaron nuevamente muestras de suelo de una profundidad de 2 a 4 cm de la parte más cercana a la raíz para cuantificar las UFC de *Trichoderma* y solo en el caso de las muestras de la octava semanas para realizar la extracción de ácidos grasos. Debido a las condiciones climáticas al momento del estudio las plantas fueron trasladadas a cámara de crecimiento a una temperatura constante de 25 ± 1 °C con fotoperiodo de 12 horas de luz. El periodo de crecimiento de las plantas correspondió a 8 semanas. Durante esta etapa se evaluaron: biomasa seca de la parte aérea y radicular, colonización micorrízica, UFC de *Trichoderma* en suelo y ácidos grasos en suelo.

5.4.2 Ensayo 2: Evaluación de la interacción en etapa simbiótica

La finalidad de este ensayo fue evaluar el efecto de *Trichoderma* sobre las comunidades nativas de HMA una vez establecida la simbiosis, para ello macetas con 200 g de sustrato fueron inoculadas con 10 g de suelo con HMA nativos, se sembraron tres semillas de maíz de las cuales 2 fueron eliminada luego de 4 días de su germinación tratando de mantener la homogeneidad en el tamaño. Las plantas fueron regadas periódicamente manteniéndolas al 80% de su capacidad de campo. Al inicio del experimento el suelo fue fertilizado como se indica en el

Anexo 3 y cada 14 días se adicionaron 4.5 ml de nitrato de amonio. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones y el diseño experimental correspondió al mismo utilizado para el ensayo 1 (Cuadro 2). Al término de 4 semanas las plantas fueron trasplantadas a macetas con 1000 g de sustrato estéril el cual había sido inoculado con *Trichoderma* a una densidad de 1×10^6 conidios/g de suelo, según el tratamiento requerido y manteniéndolas bajo las mismas condiciones de humedad y fertilización. Las plantas tuvieron un periodo de crecimiento total de 10 semanas bajo condiciones de invernadero. Al finaliza el experimento se tomaron muestras de suelo para determinar las UFC de *Trichoderma* y realizar la extracción de ácidos grasos. El experimento fue llevado a cabo entre los meses de abril a junio de 2015 con temperaturas de 25-35°C durante el día y de 10-15°C por la noche. Los parámetros evaluados fueron: biomasa seca radicular y aérea, colonización micorrízica, UFC de *Trichoderma*, ácidos grasos y determinación de N y P en tejido vegetal.

5.5 Estimación de la biomasa seca

Una vez cosechadas las plantas, se registró el peso fresco de la parte aérea y de la raíz. Posteriormente fueron colocadas en horno de secado a 80°C durante 48 horas y se registró el peso seco de ambas partes.

5.6 Conteo de UFC de *Trichoderma* en suelo

Para llevar a cabo el conteo, 1 gramo de suelo de cada maceta fue colocado en un tubo Falcón con 9 ml de agua estéril adicionada con un dispersante (Tritón al 0.01%). De esta dilución inicial (1:10) se prepararon 3 diluciones más (1:100, 1:1000 y 1:10000) y se seleccionaron las diluciones 1:100 y 1:1000 como las más idóneas para el conteo de UFC. De las diluciones seleccionadas, 100 µl fueron inoculados y sembrados por técnica de extensión en placa en medio selectivo para *Trichoderma* (Elad *et al.* 1981, modificado). De cada muestra se realizaron dos repeticiones. Las placas se dejaron incubando a 27 °C

hasta observar el crecimiento típico de colonias de *Trichoderma*. De cada muestra se hizo el promedio por cada repetición hecha y se utilizó la siguiente fórmula para determinar el número total de UFC/ g suelo seco:

$$\text{UFC/g s.s.} = \text{UFC en placa} * \frac{1}{\text{dilución utilizada}} * \frac{1}{\text{Cantidad inoculada}} / \text{Factor de corrección de humedad}$$

Para determinar el factor de corrección de humedad primeramente se obtuvo el % de humedad de cada muestra para lo cual 5 gramos fueron colocados en horno de secado durante 48 horas a 80°C, transcurrido este tiempo se tomó el peso de la muestra seca y se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Peso suelo húmedo} - \text{peso suelo seco}}{\text{Peso suelo húmedo}} * 100$$

$$\text{Factor de corrección de humedad} = 1 - (\% \text{ de humedad}/100)$$

5.7 Tinción de raíces y porcentaje de colonización micorrízica

La tinción de raíces se realizó usando el método (modificado) de Phillips y Hayman (1970). Las raíces se lavaron hasta eliminar todos los residuos de suelo y se cortaron en fragmentos de 1 cm de longitud aproximadamente. Posteriormente 2 gramos de cada muestra de raíz se colocaron en tubos Falcón y fueron cubiertos con una solución de KOH al 10%. Los tubos tapados fueron puestos en baño maría durante 15 minutos a 70°C. Transcurrido el tiempo de clareo se decantó el KOH y se enjuagaron las raíces con agua del grifo. Seguido a esto las raíces fueron cubiertas con agua oxigenada durante 30 minutos a temperatura ambiente, después de este tiempo se eliminó el agua oxigenada y se enjuagaron las raíces. Por último, se tiñeron las raíces con azul de tripano al 0.05% dejando sumergidas las raíces en el colorante durante 5 minutos en baño maría a 70°C, se eliminó el

exceso de colorante y las raíces fueron colocadas en tubos colonizadores con glicerina para su conservación.

La colonización micorrízica se realizó siguiendo el método (modificado) descrito por Giovannetti y Mosse (1980). En una caja Petri se trazó una cuadrícula de 1x1 cm, en la caja se colocaron las raíces teñidas tratando de dispersar homogéneamente toda la muestra. Con ayuda de un estereoscopio con aumento 4.5X se observaron las estructuras dentro de las raíces. Para contabilizar el porcentaje de colonización, se tomaron las líneas verticales de la caja como referencia y por cada raíz que intersectaba sobre esta línea se registró si había presencia o ausencia de estructura. Se contaron 100 intersecciones por cada muestra.

5.8 Extracción de ácidos grasos totales

La extracción de ácidos grasos totales se realizó de muestras de suelo liofilizado y pulverizado usando el método descrito por Sasser (1990) y se realizó en cuatro fases: saponificación, metilación, extracción y lavado básico. 1 g de suelo por muestra fue colocado en tubos de ensayo de vidrio, previamente esterilizados (300°C/4 hrs), se adicionaron 2 ml del reactivo 1 (Ver Anexo 4). Los tubos fueron cerrados con tapón de rosca que contenían forro de teflón y se agitaron en vortex durante 10 segundos, enseguida fueron colocados en baño maría durante 5 minutos a 100°C, terminado este tiempo los tubos fueron retirados del baño y se enfriaron ligeramente en agua, se verificó que no existieran fugas. Los tubos fueron nuevamente agitados en vortex durante 5 segundos y colocados en baño maría 25 minutos más a la misma temperatura. Después de completar los 30 minutos de saponificación los tubos se sacaron del baño maría y fueron enfriados en agua. Para la siguiente fase de metilación los tubos fueron abiertos y se les adicionó 4 ml del reactivo 2, se cerraron los tubos y se agitaron en vortex durante 10 segundos, enseguida se colocaron en baño maría durante 10 minutos a 80°C. Trascurrido este tiempo los tubos se sacaron del baño maría y se colocaron en agua con hielo con el propósito de enfriarlos rápidamente. Continuando con la fase de extracción los tubos fueron abiertos y se les adicionó

2.5 ml del reactivo 3 más 100 µl de un estándar interno (ácido graso 19:0). Los tubos fueron colocados en un rotador durante 10 minutos y posteriormente centrifugados durante 3 minutos a 2000 rpm. Los tubos se destaparon y con pipeta Pasteur estéril fue removido el sobrenadante y colocado en un nuevo tubo de ensayo. Finalmente, la etapa de lavado se realizó adicionando 6 ml del reactivo 4, se cerraron los tubos y fueron colocados en rotador durante 5 minutos y posteriormente en centrífuga durante 3 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante fue removido con pipeta Pasteur estéril y fue colocado en frascos viales para cromatógrafo para posteriormente ser evaporado con nitrógeno. La muestra en cada frasco vial fue disuelta con 80 µl de hexanos grado HPLC (Sigma-Aldrich) y agitada en vortex durante 10 segundos. En frascos viales nuevos se colocaron 200 µl de hexanos y dentro del frasco fue puesto un “baby vial” en donde se agregaron 60 µl de la muestra re suspendida anteriormente. Los tubos se cerraron y se almacenaron en congelación hasta su lectura en el cromatógrafo de gases. Para la lectura de las muestras se utilizó un cromatógrafo de gases 7890B Agilent Technologies Inc., acoplado a un computador que contiene un Sistema de Identificación Microbiana (MIS, por sus siglas en inglés). El software MIS compara el perfil de ácidos grasos de la muestra con la composición de los ácidos grasos de una librería única del MIS permitiendo obtener los nombres y la cantidad de los ácidos grasos presentes en la muestra. Una vez obtenido los perfiles de ácidos grasos de cada muestra se agruparon en 5 categorías: bacterias Gram positivo, bacterias Gram negativo, actinomicetos, hongos totales (que incluye hongos saprófitos y HMA) y HMA.

5.9 Determinación del contenido de N y P en tejido vegetal

La determinación de N y P total se realizó mediante método Semi Kjeldahl realizado en dos etapas: digestión de la muestra y cuantificación del nutrimento en el extracto digerido. Las muestras fueron digeridas en un Micro-Kjeldahl y determinadas colorimétricamente por el método de Murphy y Riley (1962). Previo a la digestión las muestras fueron molidas, tamizadas en malla de 2 mm y secadas

(50°C/24hrs). 0.25 g de cada muestra fueron colocados en tubos para digestión de 75 ml. Se prepararon dos blancos que no contenían muestra, pero recibieron el mismo tratamiento. A cada tubo con muestra vegetal se le adicionó 1 g de mezcla digestora (1 g de CuSO_4 : 10 g de K_3PO_4). En seguida se adicionaron 3 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% y se dejó en reposo durante 10 minutos hasta llevarse a cabo la reacción de oxidación. En seguida se adicionaron por muestra 7 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado al 95% y se trató de conseguir que todos los sólidos resbalaran al fondo del tubo para lograr una digestión uniforme. Las muestras se dejaron reposar durante 24 horas. Posteriormente las muestras en los tubos digestores fueron colocadas en el bloque digestor para elevar la temperatura gradualmente 50°C cada 20 minutos hasta alcanzar 375°C. Se mantuvo a esta temperatura durante 5 horas hasta que los sólidos adquirieron una coloración blanquecina y la fase líquida transparente. Finalmente se dejaron enfriar los tubos y se aforó a 250 ml con agua desionizada y se homogenizó la muestra agitando para posteriormente ser filtrada en papel Whatman No. 1 (125 mm) y recuperar el filtrado (extracto) en viales para leer en el Autoanalizador 3, Bran Luebbe.

5.10 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza simple y multifactorial para cada una de las variables y un test LSD para comparar las medias con el programa Statgraphics Centurion XV. Se aplicó la función arco seno al porcentaje de colonización micorrízica y para aquellos datos que no cumplieron con los supuestos del análisis fueron transformados utilizando logaritmo base 10. Los datos se presentan con sus valores originales.

6 RESULTADOS

6.1 Ensayo 1: Evaluación de la interacción en etapa pre-simbiótica

6.1.1 Biomasa seca y porcentaje de colonización micorrízica

Estadísticamente la interacción entre las comunidades nativas de HMA y *Trichoderma* no tuvo efecto sobre el crecimiento de las plantas (Cuadro 3), sin embargo, se observó una disminución de la biomasa seca tanto aérea como radicular en los tratamientos inoculados con la comunidad nativa Michoacán en comparación al testigo (Figura 2a). De manera similar la biomasa radicular se vio reducida en las plantas inoculadas con la comunidad de HMA Edo. de México (Figura 2b). El mayor porcentaje de colonización micorrízica (84%) se obtuvo de las plantas inoculadas con la comunidad nativa Guanajuato independientemente de la cepa de *Trichoderma* con la cual interactuó (Figura 3). A nivel general la presencia de *Trichoderma* no afectó la colonización en ninguno de los tratamientos (cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza de la biomasa seca aérea y radicular y porcentaje de colonización micorrízica. Ensayo 1. * = $P \leq 0.05$

Factor	Biomasa aérea	Biomasa radicular	% Colonización
<i>Inóculo HMA</i>	*	*	*
<i>Trichoderma</i>	0.2755	0.3065	0.8477
<i>HMA x Trichoderma</i>	0.0991	0.2198	0.3035

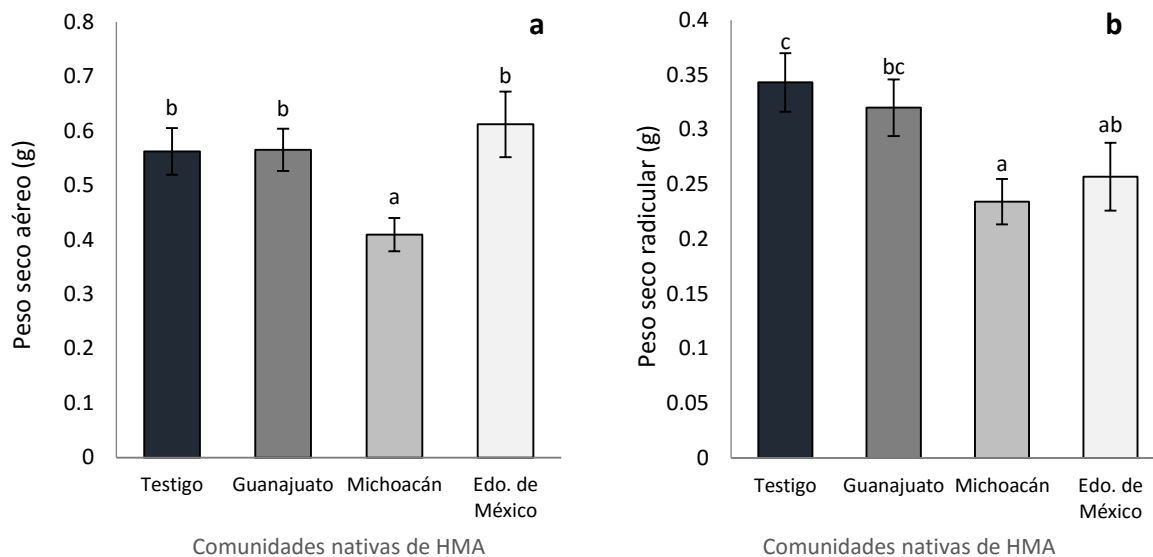


Figura 2. Biomasa seca (g) **a)** aérea y **b)** radicular, después de 8 semanas de crecimiento. Ensayo 1. Se muestran los tratamientos agrupados por factor significativo HMA. El testigo incluye los tratamientos sin presencia de las comunidades nativas de HMA y el testigo absoluto. Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de $n=20$ con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

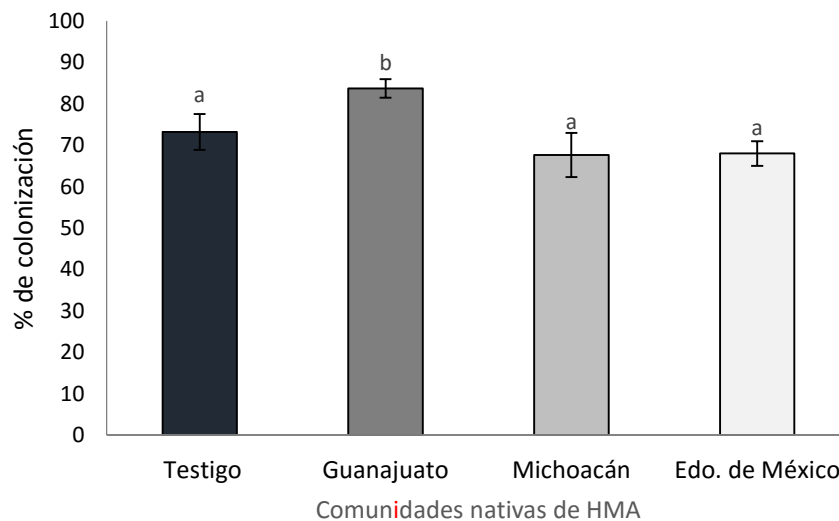


Figura 3. Porcentaje de colonización micorrízica (E1). Se muestran los tratamientos agrupados por factor significativo HMA. El testigo incluye los tratamientos inoculado con las tres comunidades nativas de HMA sin cepas de *Trichoderma*. Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de $n=15$ con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

6.1.2 Densidad de *Trichoderma* (UFC/g)

Después de 14 días de su aplicación en el suelo la población de las tres cepas de *Trichoderma* presentó una reducción en el número de colonias respecto a la densidad inicialmente inoculada. Se observó que la densidad de *T. harzianum* cp. 38 fue mayor (3.11×10^5 UFC/g) comparada con las cepas de *T. viride* cp. 56 y Tricsoil las cuales registraron 2.6×10^5 UFC/g y 2.05×10^5 UFC/g respectivamente (Figura 4). Por otra parte, los tratamientos de *T. harzianum* cp. 38 y *T. viride* cp. 56 co-inoculados con las poblaciones nativas de HMA presentaron una mayor prevalencia en el suelo, aunque estadísticamente las poblaciones nativas de HMA no afectaron la densidad de *Trichoderma* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza de las UFC/g por muestreo. Ensayo 1. *= $P \leq 0.05$

Factor	14 días	42 días	56 días	70 días
<i>Inóculo HMA</i>	0.0891	*	*	*
<i>Trichoderma</i>	*	*	*	*
<i>HMA x</i> <i>Trichoderma</i>	0.216	0.0883	0.2053	0.1375

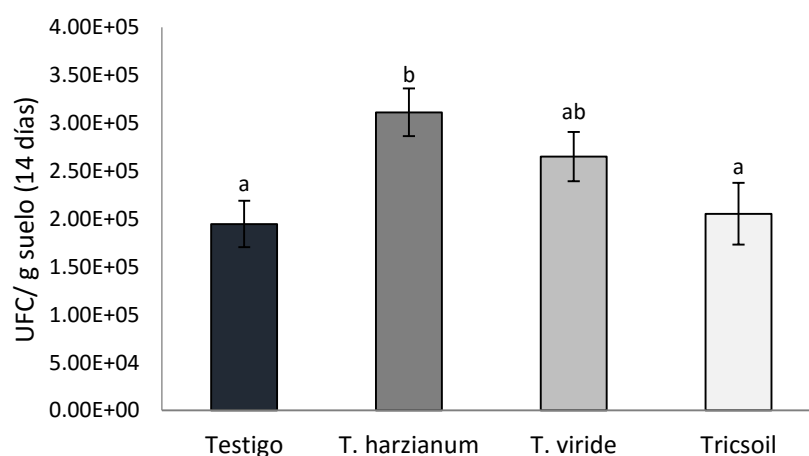


Figura 4. Unidades formadoras de colonia (UFC/ g suelo) de *Trichoderma* después de 14 días de su aplicación (E1). Se muestran los tratamientos agrupados por factor significativo *Trichoderma*. El testigo incluye los tratamientos de las tres cepas de *Trichoderma* y el testigo absoluto en ausencia de las comunidades de HMA. Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de $n=15$ con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

A los 42 días después de haber inoculado *Trichoderma* y con las plantas de un mes de crecimiento se observó que la densidad promedio de las cepas de *T. harzianum* (2.46×10^5 UFC/g) y *T. viride* (2.13×10^5 UFC/g) fue significativamente mayor respecto al testigo (1.33×10^5 UFC/g), mientras que la cepa de Tricsoil tuvo una reducción en el número de colonias presentes en el suelo (Figura 5a). En el caso de la densidad de *T. harzianum* y *T. viride* se observó que esta fue mayor cuando se encontraba en presencia de los inóculos micorrízicos, principalmente con el inóculo Edo. de México (Figura 5b).

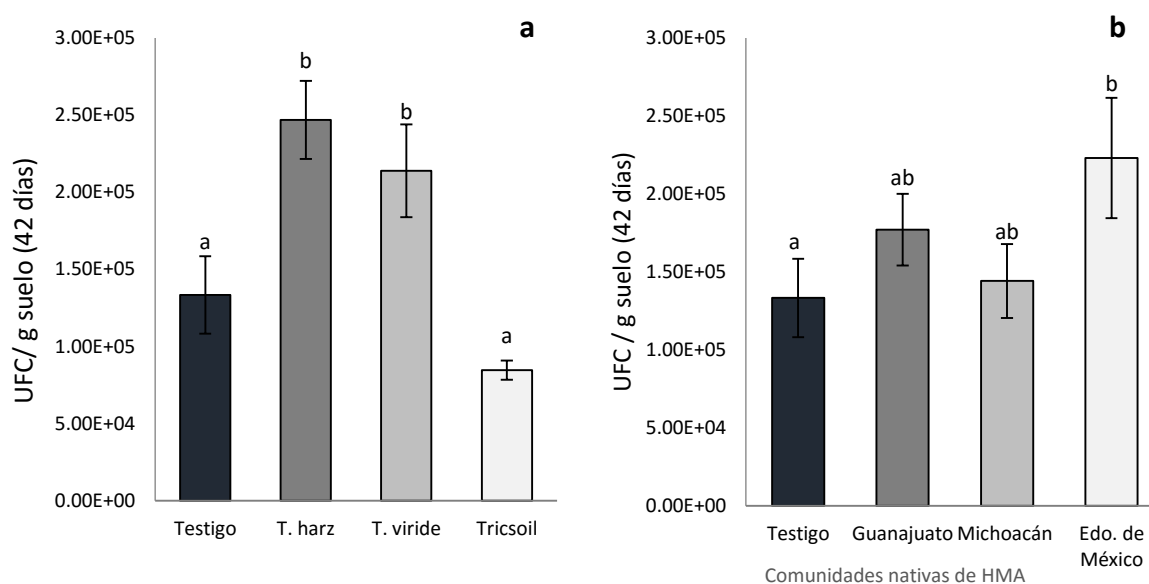


Figura 5. Unidades formadoras de colonia (UFC) de *Trichoderma* por gramos de suelo después de 42 días de la inoculación, **a)** Se muestran los tratamientos agrupados por factor significativo *Trichoderma*. **b)** Se muestran los tratamientos agrupados por factor significativo HMA (E1). El testigo incluye los tratamientos de las tres cepas de *Trichoderma* en ausencia de las comunidades de HMA. Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de $n=15$ con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

56 días después de la inoculación la densidad de Tricsoil (7.12×10^4 UFC/g) fue significativamente menor en comparación con las otras cepas y con el testigo (Figura 6a). En este tiempo de muestreo se determinó que la presencia de del inóculo Michoacán reduce significativamente la densidad de las cepas de *Trichoderma* (Figura 6b). Finalmente, a los 70 días después de haber inoculado las diferentes cepas de *Trichoderma* se observó la misma tendencia que en el

muestreo anterior, ya que nuevamente la cepa de Tricsoil se registró con una densidad de 8.25×10^4 UFC/g que fue significativamente inferior a la densidad registrada para *T. harzianum*, *T. viride* y el testigo (Figura 7a). A nivel general, la densidad de las cepas de *Trichoderma* se vio afectada por la presencia del inóculo Michoacán (Figura 7b).

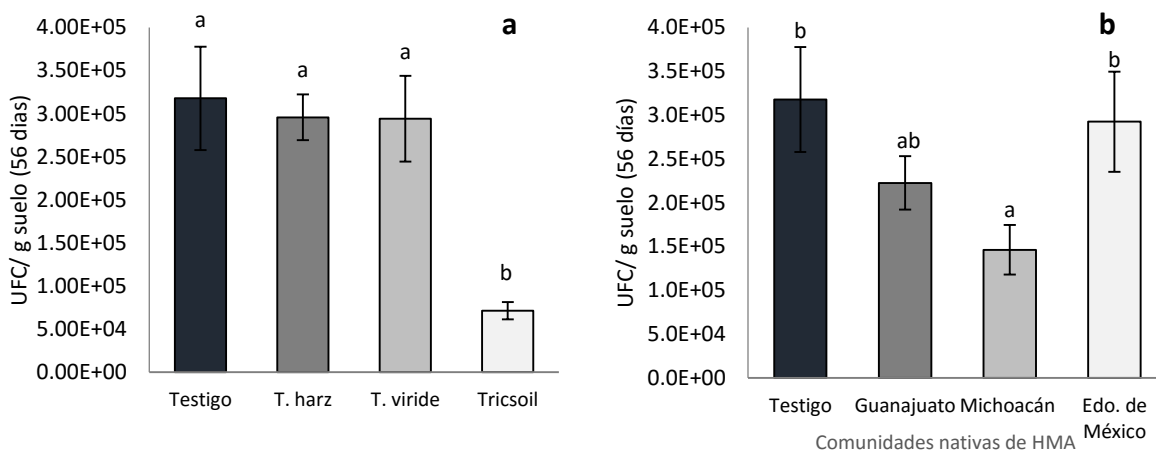


Figura 6. Unidades formadoras de colonia (UFC/ g suelo) de *Trichoderma* después de 56 días de la inoculación (E1). **a)** Se muestran los tratamientos agrupados por factor significativo *Trichoderma*. **b)** Se muestran los tratamientos agrupados por factor significativo HMA. El testigo incluye los tratamientos de las tres cepas de *Trichoderma* en ausencia de las comunidades de HMA. Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de n=15 con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

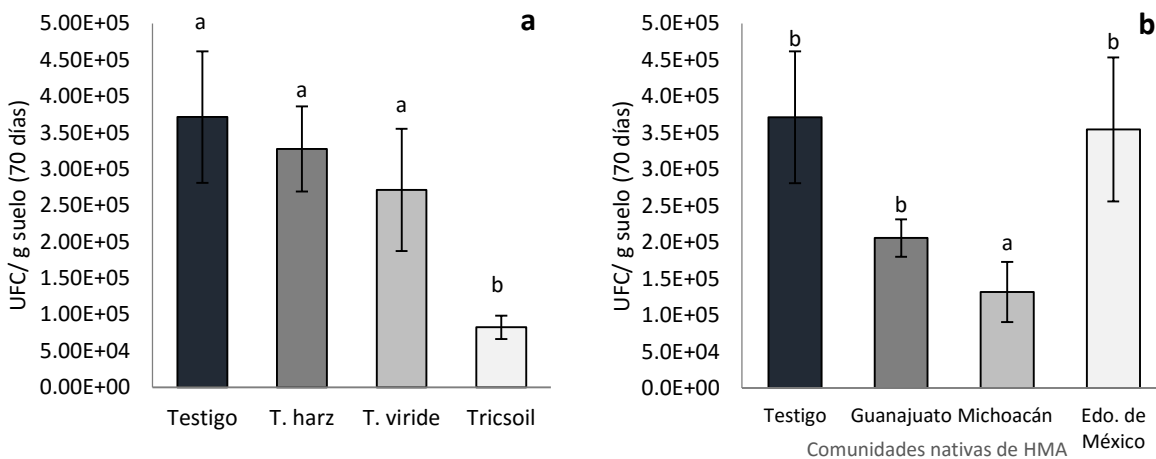


Figura 7. Unidades formadoras de colonia (UFC/ g suelo) de *Trichoderma* después de 70 días de la inoculación (E1). **a)** Se muestran los tratamientos agrupados por factor significativo *Trichoderma*. **b)** Se muestran los tratamientos agrupados por factor significativo HMA. El testigo incluye los tratamientos de las tres cepas de *Trichoderma* en ausencia de las comunidades de HMA. Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de n=15 con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

6.1.3 Ácidos grasos

En el primer muestreo realizado al final del periodo de incubación y en ausencia de planta, no se encontraron diferencias entre tratamientos en la cantidad tanto de bacterias Gram negativo como Gram positivo (Cuadro 5), solo se observó que la abundancia de bacterias Gram positivo fue mayor.

Cuadro 5. Análisis de varianza de ácidos grasos de los diferentes grupos de microorganismos del primer muestreo. Ensayo 1. * = $P \leq 0.05$.

Factor	Gram +	Gram -	Actinos	Hongos	HMA
<i>Inóculo HMA</i>	0.117	0.2913	-	*	*
<i>Trichoderma</i>	0.5506	0.5369	-	0.3150	0.1219
<i>HMA x Trichoderma</i>	0.4324	0.0883	-	0.4339	0.6676

El perfil de ácidos grasos del primer muestreo del grupo de los hongos totales mostró solo diferencias dependiendo del inóculo nativo de HMA, observándose una mayor abundancia en los tratamientos que tenían el inóculo de Guanajuato y Edo. de México (Figura 8a). Dentro del perfil de ácidos grasos del grupo de los hongos totales se seleccionó solo el biomarcador de los HMA, el ácido graso 16:1 ω 5c observándose la misma tendencia de abundancia que en el grupo de hongos totales (Figura 8b). Cabe mencionar que en este primer muestreo y en base al perfil de ácidos grasos no se encontró presencia de actinomicetos.

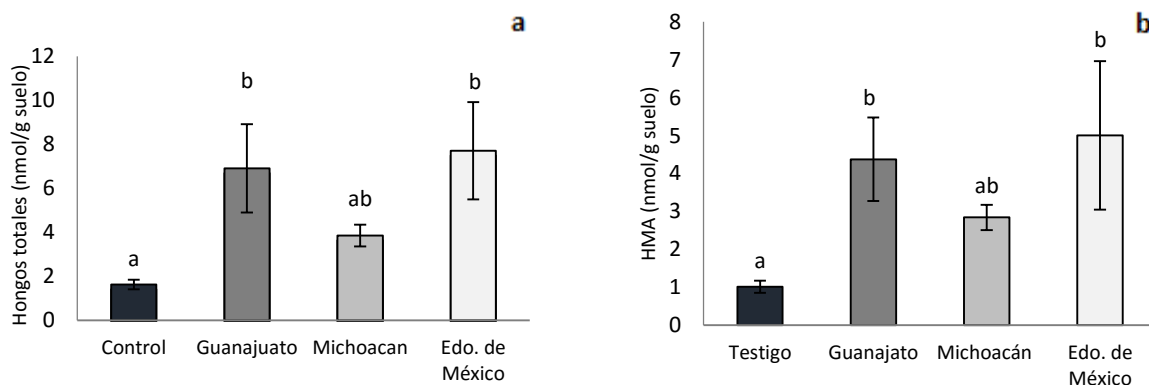


Figura 8. Perfil de ácidos grasos de a) hongos totales y b) comunidades nativas de HMA (E1). Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de $n=12$ con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

En el último muestreo realizado al final del ensayo nuevamente se determinó el perfil de ácidos grasos de los cuatro grupos de microorganismos antes mencionados. Se observó que como en el primer muestreo la abundancia de bacterias Gram positivo fue mayor comparada con la abundancia de las Gram negativo sin diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 6), pero de acuerdo a los biomarcadores, la abundancia de ambos grupos de microorganismos aumentó con el paso del tiempo.

Cuadro 6. Análisis de varianza de ácidos grasos de los diferentes grupos de microorganismos. Ultimo muestreo, ensayo 1. * = $P \leq 0.05$.

Factor	Gram +	Gram -	Actinos	Hongos	HMA
<i>Inóculo HMA</i>	0.0585	0.4339	0.2124	*	*
<i>Trichoderma</i>	0.8203	0.8793	0.1208	0.1797	0.0540
<i>HMA x Trichoderma</i>	0.2931	0.2228	*	0.2145	0.1480

A diferencia del primer muestreo, al finalizar el experimento los biomarcadores de ácidos grasos indicaron la presencia de actinomicetos mostrando una mayor abundancia en el tratamiento inoculado solo con Tricsoil y en el tratamiento co-inoculado con la población nativa de HMA Edo. de México y *T. harzianum* (Figura 9).

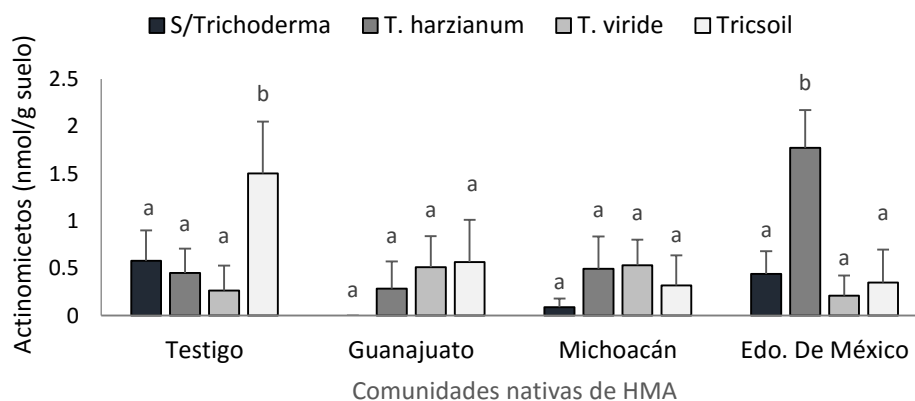


Figura 9. Perfil de ácidos grasos de actinomicetos. Ultimo muestreo, ensayo 1. Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de $n=3$ con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

Finalmente, el perfil de ácidos grasos de hongos totales y HMA realizado al finalizar el ensayo mostró únicamente diferencias significativas entre las comunidades nativas de HMA, observándose una mayor abundancia de hongos totales y hongos micorrízicos en los tratamientos en presencia de los inóculos Guanajuato y Edo. de México (Figura 10).

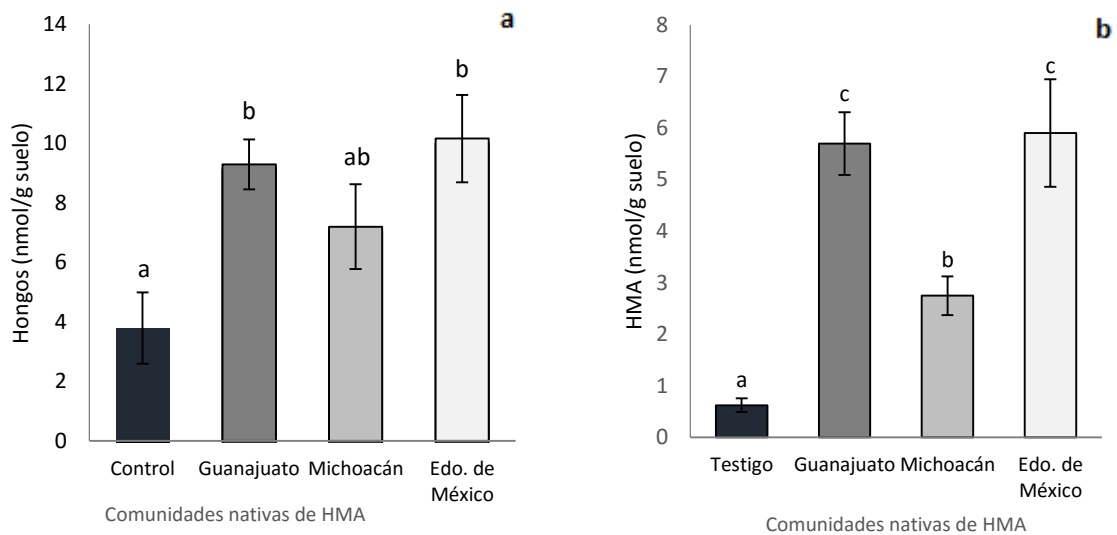


Figura 10. Perfil de ácidos grasos de **a)** hongos totales y **b)** comunidades nativas de HMA del último muestreo, ensayo 1. Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de n=12 con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

6.2 Ensayo 2: Evaluación de la interacción en etapa simbiótica

6.2.1 Biomasa seca, porcentaje de colonización micorrízica y densidad de *Trichoderma*

Los resultados obtenidos en relación a la biomasa seca tanto aérea como radicular indicaron que la interacción de los factores no tuvo efectos sobre el crecimiento de las plantas (Cuadro 7). Sin embargo, se observó que la biomasa seca es mayor en aquellos tratamientos inoculados con las comunidades nativas Michoacán y Edo de México independientemente de la cepa de *Trichoderma* con que se encontrara (Figura 11).

Cuadro 7. Análisis de varianza de la biomasa seca aérea y radicular, porcentaje de colonización micorrízica y UFC de *Trichoderma*. Ensayo 2. * = $P \leq 0.05$

Factor	Biomasa aérea	Biomasa radicular	% de colonización	UFC de <i>Trichoderma</i>
<i>Inóculo HMA</i>	*	*	*	*
<i>Trichoderma</i>	0.3133	0.5596	0.3658	*
<i>HMA x Trichoderma</i>	0.0636	0.7329	0.4466	*

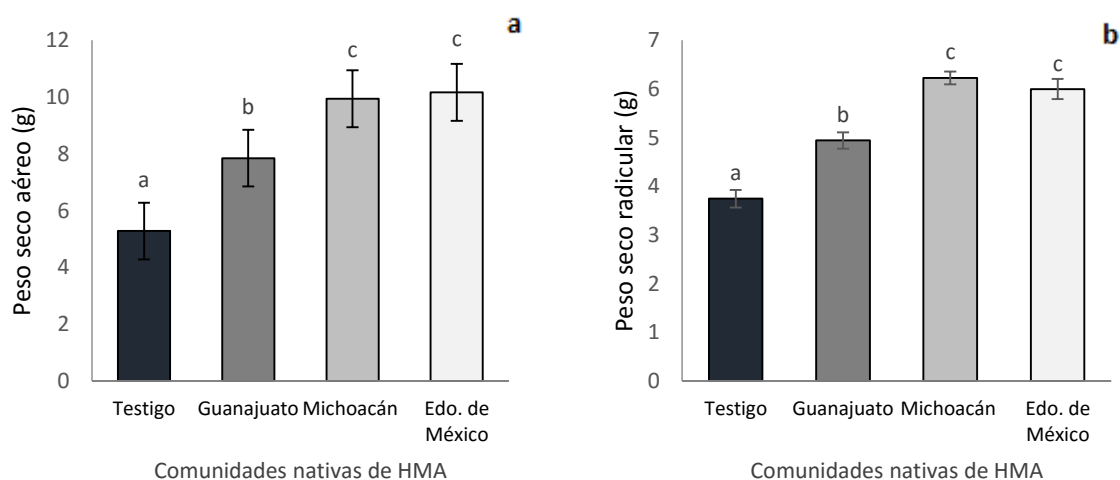


Figura 11. Biomasa seca **a)** aérea **b)** radicular. Ensayo 2. Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de $n=20$ con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

La colonización micorrízica no fue afectada por la presencia de *Trichoderma* en ningún tratamiento (Cuadro 7). Los tratamientos con inóculo Edo. de México presentaron el menor porcentaje de colonización (promedio 56.21%) en comparación con los tratamientos que tenían los inóculos Guanajuato y Michoacán (Figura 12). Respecto a la densidad de *Trichoderma* en el suelo se observó que la abundancia depende tanto de la cepa de *Trichoderma* como de la presencia del inóculo de HMA con que interactúa (Cuadro 7). Se observó que la densidad de *T. harzianum* es menor cuando se encuentra en presencia del inóculo Edo. de México (6.59×10^4 UFC/g) comparada frente al testigo (3.74×10^5 UFC/g), de igual manera la densidad de la cepa de *T. viride* se ve afectada por la presencia del inóculo Michoacán (4.59×10^4 UFC/g) en comparación al testigo cuya densidad fue de 1.18×10^5 UFC/g (Figura 13). La cepa de Tricsoil no se vio afectada por ninguna de las comunidades nativas de HMA, pero su abundancia en el suelo fue menor comparada con las cepas de *T. harzianum* y *T. viride*.

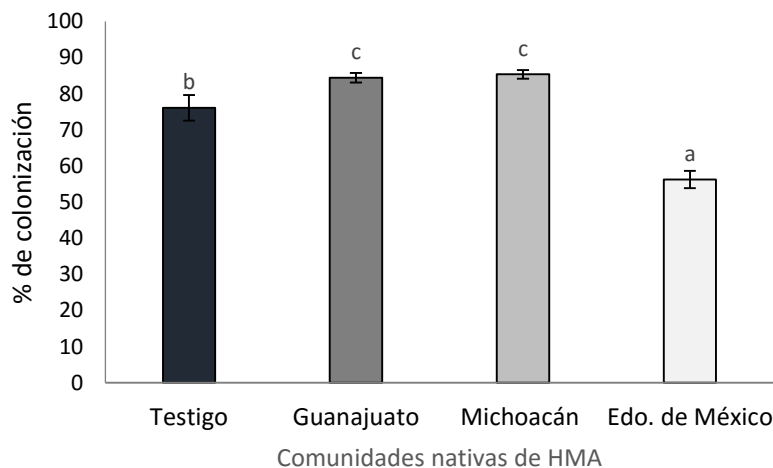


Figura 12. Porcentaje de colonización micorrízica. (E2). Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de $n=15$ con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

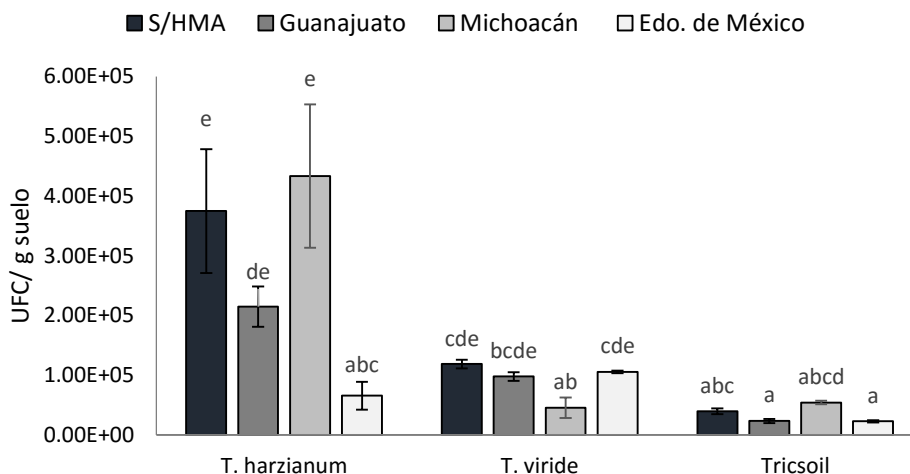


Figura 13. Unidades formadoras de colonia (UFC/ g suelo) de *Trichoderma* (E2). Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de n=5 con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

6.2.2 Contenido de N y P en tejido vegetal

En base a los resultados obtenidos para el contenido de N se observó que la concentración es mayor en el tejido vegetal en los tratamientos solo inoculados con las cepas de *Trichoderma* y en el testigo absoluto (Figura 14). La interacción de ambos factores no tuvo efecto sobre el contenido de N. El contenido de P en el tejido vegetal fue significativamente mayor en todos los tratamientos inoculados con las comunidades nativas de HMA (Figura 15) independiente de la cepa de *Trichoderma* con la cual interactuó (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de varianza del contenido de N y P en tejido vegetal (E2). * = $P \leq 0.05$

Factor	N	P
<i>Inóculo HMA</i>	*	*
<i>Trichoderma</i>	*	0.5136
<i>HMA x Trichoderma</i>	0.1581	0.6658

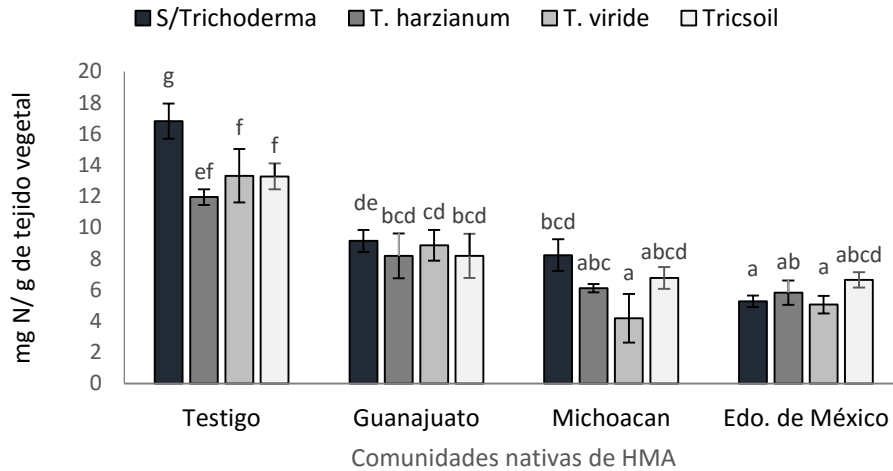


Figura 14. Contenido de N en tejido vegetal (E2). Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de n=5 con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

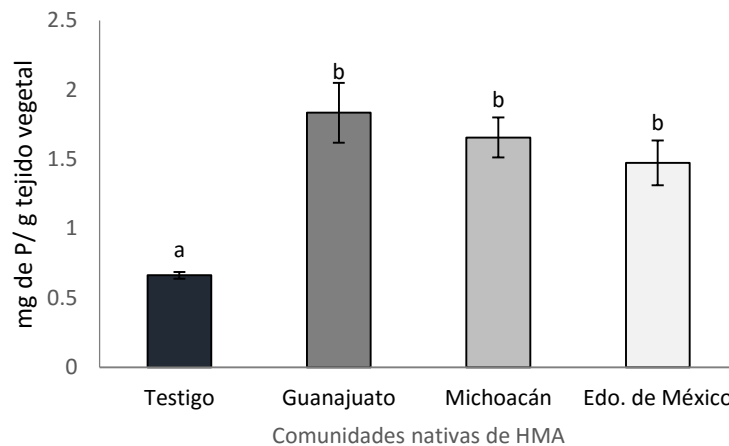


Figura 15. Contenido de P en tejido vegetal (E2). Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de n=20 con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

6.2.3 Ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos realizado al finalizar el experimento mostró que la interacción de los factores tiene un efecto significativo sobre la abundancia de los diferentes grupos de microorganismos evaluados (Cuadro 9). En el caso de las bacterias Gram positivo se observó que a nivel general su abundancia es mayor en presencia de los inóculos micorrízicos. Comparado con el testigo y con las cepas de *T. viride* y Tricsoil

la abundancia de las bacterias Gram positivo es mayor en presencia del inóculo de *T. harzianum*. Los resultados mostraron que la presencia de estas bacterias varía dependiendo de la combinación de la comunidad nativa de HMA con las cepas de *Trichoderma* ya que mientras la co-inoculación de la comunidad nativa Michoacán con cualquier cepa de *Trichoderma* parece aumentar la abundancia, para los tratamientos inoculados con la comunidad Edo. de México con o sin *Trichoderma* parece no afectar la presencia de dichas bacterias. Para el caso de los tratamientos con presencia de la comunidad nativa Guanajuato la abundancia es mayor cuando solo se encuentra en combinación con Tricsoil (Figura 16a).

La abundancia de bacterias Gram negativo generalmente fue mayor cuando había presencia de las comunidades nativas de HMA. En todos los tratamientos inoculados con la comunidad nativa Guanajuato en combinación de las cepas de *Trichoderma* hubo mayor abundancia comparada con el testigo y con los tratamientos que solo tenía *T. viride* o Tricsoil. En los tratamientos inoculados con la comunidad nativas Michoacán se observó que la abundancia es significativamente mayor solo si encuentra en combinación con las cepas de *Trichoderma* (Figura 16.b)

Cuadro 9. Análisis de varianza de ácidos grasos de los diferentes grupos de microorganismos. Ensayo 2. * = $P \leq 0.05$.

Factor	Gram +	Gram -	Actinos	Hongos	HMA
<i>Inóculo HMA</i>	*	*	*	0.3806	*
<i>Trichoderma</i>	*	*	*	*	0.0755
<i>HMA x Trichoderma</i>	*	*	*	*	0.0586

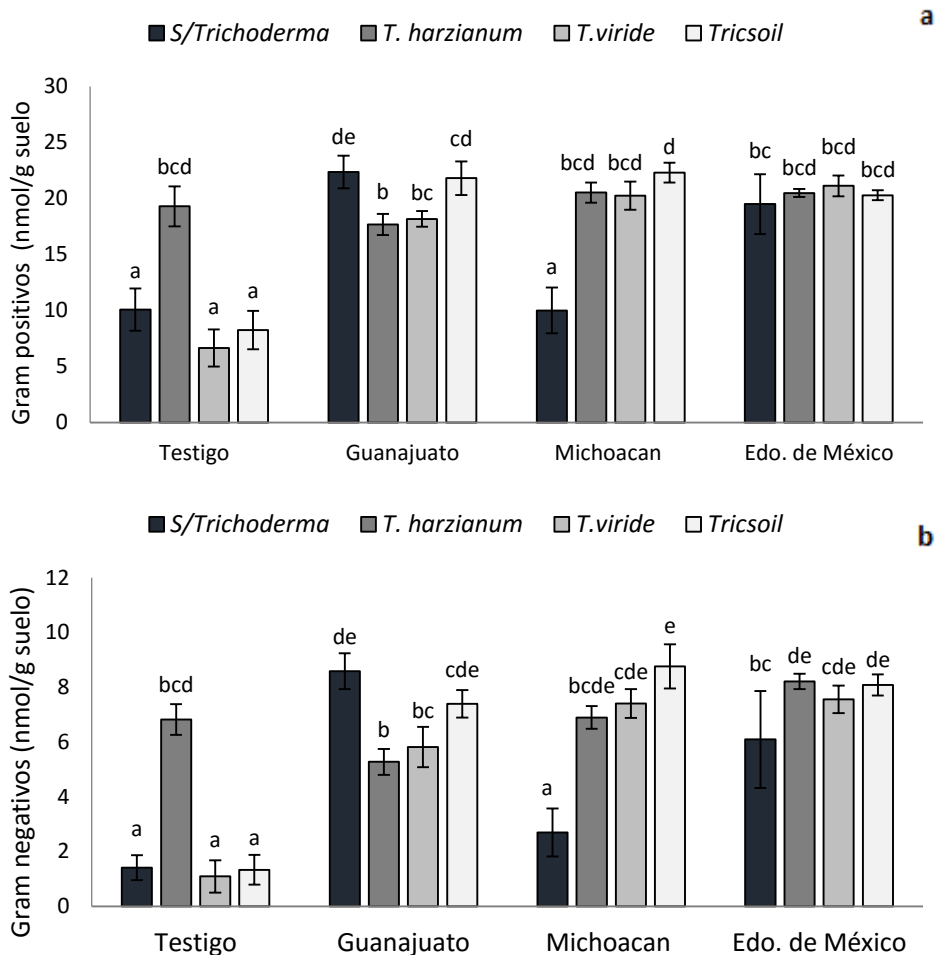


Figura 16. Perfil de ácidos grasos de bacterias **a)** Gram positivo y **b)** Gram negativo (E2). Se muestra la media y su error estándar estimado a estimado a partir de n=5 con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

Para los actinomicetos se observó la misma tendencia de las bacterias Gram positivo y Gram negativo, donde se muestra una mayor abundancia en los tratamientos con poblaciones nativas de HMA. La abundancia de los actinomicetos no se vio afectada con la combinación de la comunidad nativa Edo. de México y las cepas de *Trichoderma*. Un mayor número de actinomicetos se observó en los tratamientos que contenían el inóculo de Michoacán solo cuando estaban en combinación con las cepas de *Trichoderma*, en tanto que en aquellos tratamientos con inóculo Guanajuato la abundancia de actinomicetos fue menor cuando se encontró en combinación con las cepas de *T. harzianum* y *T. viride* (Figura 17).

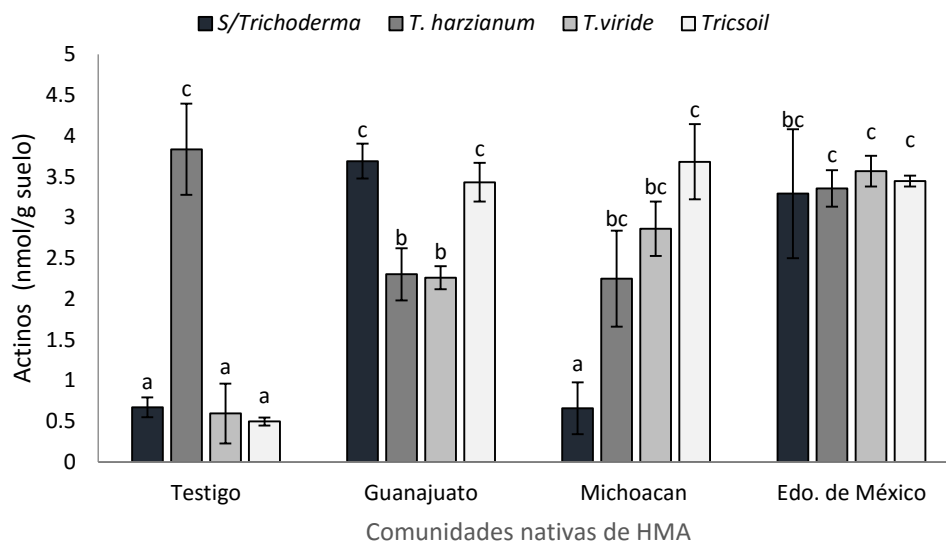


Figura 17. Perfil de ácidos grasos de actinomicetos (E2). Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de n=5 con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

El perfil de ácidos grasos de hongos totales mostró una mayor abundancia en los tratamientos inoculados con las comunidades nativas de Guanajuato y Michoacán independientemente de la cepa de *Trichoderma* con que se encontrara combinado. Como era de esperarse, todos los tratamientos inoculados con las comunidades nativas de HMA de acuerdo al perfil de ácidos grasos tuvieron una mayor densidad de hongos totales (Figura 18a). En cuanto a la abundancia de HMA en el suelo, el perfil de ácidos grasos mostró que su abundancia fue mayor en los tratamientos con inóculo Guanajuato y Michoacán. Con respecto a un aumento en la abundancia de HMA por la interacción con cepas de *Trichoderma*, esta solo fue observada con el inóculo de Michoacán (Figura 18b).

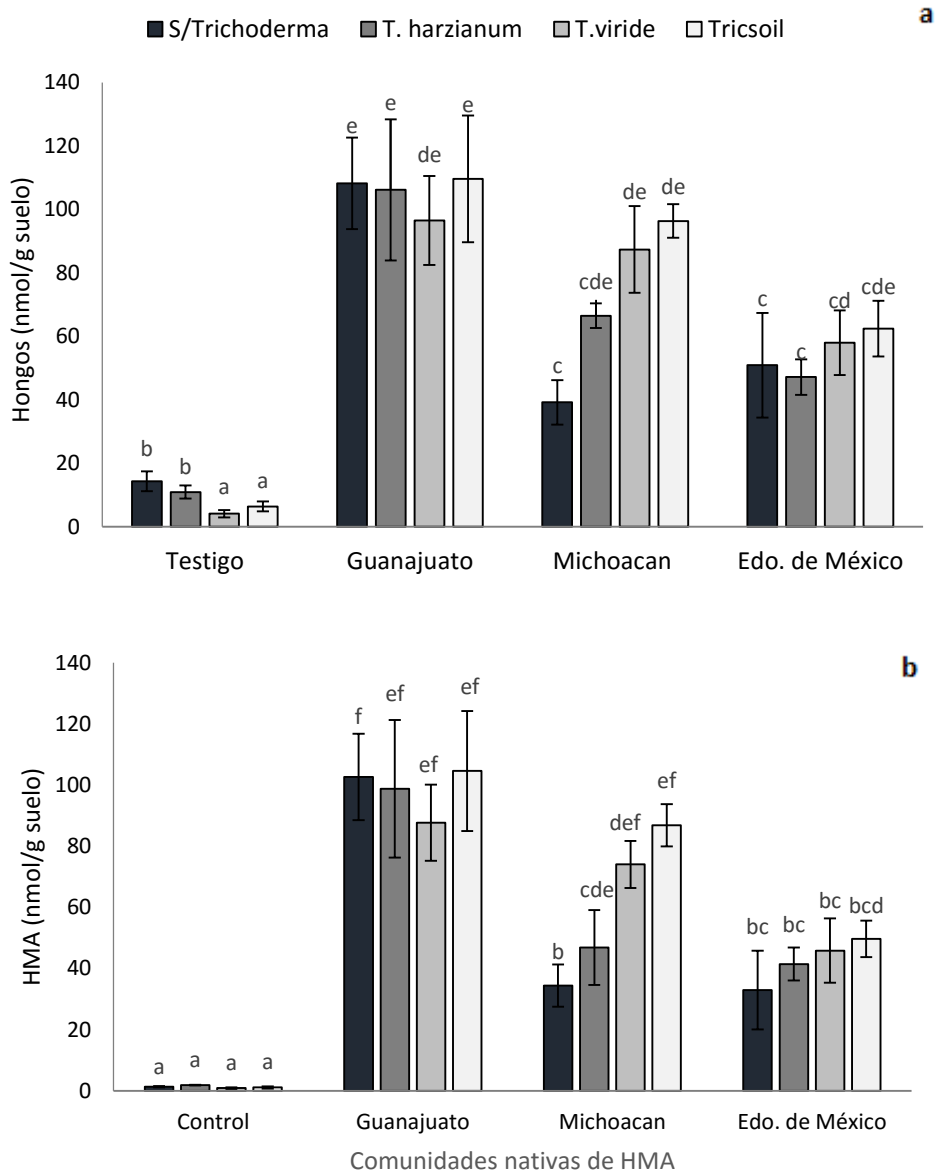


Figura 18. Perfil de ácidos grasos de a) hongos totales y b) HMA (E2). Se muestra la media y su error estándar estimado a partir de n=5 con un test de significancia LSD y $p \leq 0.05$.

7 DISCUSIÓN

7.1 Ensayo 1: Evaluación de la interacción en etapa pre simbiótica.

Generalmente la relación entre HMA y su planta hospedera resulta ser benéfica en función al aporte nutricional entre ambas partes, en las plantas este beneficio puede verse reflejado en un mayor crecimiento. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos en el primer ensayo se observó que la biomasa seca tanto aérea como radicular fue afectada por la presencia de las comunidades nativas de HMA Michoacán y Edo. de México. Este comportamiento supresivo del crecimiento por parte de lo HMA se ha reportado previamente (Li *et al.* 2008). Vázquez *et al.* (2000) observaron que la inoculación con una comunidad nativa de hongos micorrízicos tiene un efecto adverso sobre el crecimiento de plantas de maíz. Facelli *et al.* (2010) reportaron que la biomasa aérea seca de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) disminuyó cuando estas fueron inoculadas con *Glomus intraradices*. La tendencia por parte de los hongos micorrízicos en este caso podría deberse a que la demanda de C es mayor por parte del hongo y el aporte de nutrientes por parte de este a la planta muy bajo. Smith y Smith (2012) describen este fenómeno como un flujo no equilibrado de nutrientes, aunque no propiamente se puede considerar parasitismo porque si existe intercambio de nutrientes. Otros factores que podrían estar interviniendo con esta respuesta son las condiciones ambientales (temperatura, humedad, luz) y las condiciones experimentales. Como se menciona, las plantas en este experimento fueron afectadas por las condiciones climatológicas principalmente la temperatura y por la intensidad luminosa (Johnson *et al.* 1997). Estudios sugieren que esta reducción del crecimiento puede estar relacionada con una baja colonización de las raíces por parte de los HMA (Grace *et al.* 2009), sin embargo, en los resultados de este ensayo se puede mostrar que todos los inóculos presentaron un alto porcentaje de colonización, aunado a esto se observó (Ver Anexo 5), aunque no se realizó conteo por estructuras, que los inóculos Michoacán y Guanajuato presentaron gran cantidad de vesículas dentro de la raíz, estas estructuras son el principal reservorio de energía de los hongos y se forman a partir de las hexosas aportada

por la plantas (van Aarle y Olsson, 2003), por tal motivo podría suponerse que el exceso de vesículas se debe a una alta demanda de C por parte del hongo, que quizá por condiciones adversas en el crecimiento está asegurando su supervivencia y aportando pocos nutrientes a la planta.

Por otro lado, se observó que la co-inoculación de las comunidades nativas de HMA con *Trichoderma* no tuvo un efecto sobre el crecimiento de las plantas y que en este caso *Trichoderma* no afectó la colonización micorrízica, si no por el contrario, en los tratamiento inoculados con la comunidad nativa Guanajuato se puede apreciar un aumento en el porcentaje de colonización cuando está en combinación con las cepas de *Trichoderma*, lo cual coincide con lo reportado por Calvet *et al.* (1993) donde la inoculación con *T. aureoviride* previo al desarrollo de la simbiosis de *G. mosseae* aumenta el porcentaje de colonización en raíces de *Tagetes erecta*. Fraccia *et al.* (2000) hipotetizan que los exudados de hongos saprofitos estimulan la germinación de esporas de hongos micorrízicos arbusculares.

En cuanto la densidad de *Trichoderma* en el suelo reportada como UFC se observó que después de 14 días de haber inoculado y en ausencia de planta su abundancia fue mayor cuando se encontraba en presencia de los inóculos micorrízicos, aunque estadísticamente estas diferencias no fueron significativas. En base a los resultados se observó que las cepas *T. harzianum* y *T. viride* tuvieron una mayor prevalencia en el suelo, lo cual puede estar directamente relacionado con la viabilidad de las esporas. A los 42 días cuando la planta tenía un mes de crecimiento se observó que la abundancia de las cepas de *Trichoderma* fue mayor cuando se encontraban en presencia del inóculo del Edo. de México, pero se observó una significativa reducción en la densidad de Tricsoil, que como se menciona el apartado anterior tuvo un porcentaje de germinación menor al 20%. En los siguientes muestreos (56 y 70 días) se observó que a diferencia de los resultados del muestreo de los 42 días la densidad de *Trichoderma* disminuye considerablemente cuando está en combinación con la comunidad de HMA Michoacán. Esto puede deberse a que en la etapa pre simbiótica de los hongos micorrízicos su presencia, o bien la falta de micelio

extraradical, no perjudica el crecimiento de *Trichoderma*, pero a medida que la simbiosis se va desarrollando tiene un efecto negativo sobre el desarrollo del hongo quizá debido a la competencia por espacio o por nutrientes. Este comportamiento ha sido reportado por Green *et al.* (1999) donde muestran que hifas del hongo micorrízico *G. intraradices* afecta el crecimiento de *T. harzianum* en el suelo además que afectar su actividad metabólica (b-glucuronidasa). Chandanie *et al.* (2009) también reportan un efecto supresivo de *T. harzianum* por parte de *G. mosseae*, pero observaron que este efecto negativo se hizo presente después de 6 semanas de haber inoculado el hongo micorrízico en comparación a las 4 semanas cuando el crecimiento aun no era afectado, este comportamiento lo atribuyen a factores mediadores de la simbiosis micorrízica más que a la competición directa. Por otro lado, también puede suponerse que los HMA presentes en el inóculo están absorbiendo gran parte de los recursos carbonados de la planta evitando su liberación hacia el exterior lo cual limita los nutrientes para el crecimiento de *Trichoderma*

El perfil de ácidos grasos mostró y como era de esperarse que la mayor abundancia de microorganismos se encontró en los tratamientos inoculados con las comunidades nativas ya que no era inóculos puros. Los biomarcadores mostraron que en el suelo había mayor cantidad de micelio y/o esporas de HMA en los tratamientos que con los inóculos Guanajuato y Edo. de México. En general puedo observarse que en todas las variables evaluadas la interacción entre la comunidad nativa de HMA Michoacán y las cepas de *Trichoderma* ejerce un efecto negativo. Esto debido quizá a la falta de compatibilidad entre las especies presentes en el inóculo y *Trichoderma* además de otros factores biológicos, Si bien cada especie y/o cepa de *Trichoderma* puede generar diversos efectos sobre las plantas y sobre los microorganismos con los que interactúa y tener diferentes niveles de micoparasitismo

7.2 Ensayo 2: Evaluación de la interacción en etapa simbiótica.

En contraste con los resultados del ensayo 1, en el ensayo 2 se observó que todos los tratamientos inoculados con las comunidades nativas de HMA tuvieron un incremento en la biomasa tanto aérea como radicular, principalmente con el inóculo Michoacán y Edo. de México lo cual está directamente relacionado con el contenido de P en tejido vegetal donde pudo observarse que en las plantas inoculadas con las comunidades nativas de HMA fue mayor a diferencia de aquellas plantas no inoculadas o con solo las cepas de *Trichoderma*. En la mayoría de los estudios relacionados al aporte nutricional se reporta este efecto benéfico por parte de los hongos micorrízicos (Gianinazzi *et al.* 2010; Smith y Read, 2008; Kaepler *et al.* 2000). Respecto al contenido de N este fue mayor en las plantas no inoculadas con HMA. Reynolds *et al.* (2005) mencionan que los HMA no promueven la adquisición de N en suelos deficientes de este nutriente, sin embargo, una posible explicación de este resultado es que la plantas control y las inoculadas solo con *Trichoderma* fueron plantas más pequeñas por la tanto la concentración de N está en proporción inversa al tamaño de las plantas. Los resultados mostraron que la interacción entre las cepas de *Trichoderma* y las comunidades nativas de HMA no tuvo efecto sobre el crecimiento de las plantas como reportan Sosa-Rodriguez *et al.* (2006) que la inoculación de una población nativas de HMA y *T. harzianum* no tuvo efecto aditivo sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens*, mientras McAllister *et al.* (1993) reportan que la interacción entre *T. koningii* y *G. mosseae* tiene un efecto neutral sobre el crecimiento de plantas de maíz y lechuga. En contraste a estos resultados Kaushish *et al.* (2012) reporta un efecto benéfico de la interacción entre *T. viride* y *G. mosseae* sobre el crecimiento de *Rauwolfia serpentina* cuyo crecimiento fue mayor comparado con los tratamientos inoculados de manera individual, mientras que Haggag *et al.* (2001) reportan un efecto sinérgico entre *T. harzianum* y *G. mosseae* a incrementar la biomasa de plantas de geranio (*Geranium*). Estos resultados

sugieren que la interacción entre HMA y *Trichoderma* varía dependiendo de la especie fúngica, así como de la planta hospedera.

Respecto a la colonización micorrízica esta no se vio afectada por la presencia de *Trichoderma* en ninguno de los tratamientos lo cual concuerda con lo reportado por Vázquez *et al.* (2000) donde reportan que una cepa de *T. harzianum* no afectó el desarrollo de la colonización micorrízica y como muestran los resultados de este trabajo la habilidad para colonizar dependió del inóculo nativo.

Con respecto a la densidad de *Trichoderma* en suelo la cepa de *T. harzianum* se ve afectada cuando se encuentra en presencia del inóculo Edo. de México. Esta respuesta puede deberse a que el establecimiento de la simbiosis micorrízica ocasiona cambios fisiológicos y bioquímicos sobre la planta hospedera y tales cambios pueden estar alterando la composición de los exudados radicales los cuales desempeñan un papel importante en la modificación de las comunidades microbianas de la rizosfera (Linderman 1992; Chandanie *et al.* 2009), incluso una competencia directa entre el micelio extraradical de los HMA y *Trichoderma* por los sitios de colonización y nutrientes podría estar ocurriendo.

Los marcadores de ácidos grasos indicaron una tendencia para el grupo de bacterias Gram positivo, Gram negativo y actinomicetos. Se observó que estos tres grupos de microorganismos aumentan su abundancia en el suelo cuando se encuentran en presencia de la cepa de *T. harzianum*. Este comportamiento puede explicarse debido a que las plantas inoculadas con *T. harzianum* presentaron una mayor biomasa en comparación a las plantas control y a la inoculadas con *T. viride* o con Tricsoil, por lo tanto, al ser plantas más grandes con una mayor biomasa radicular hay mayor cantidad de exudados que promueve la abundancia de estos microorganismos. Por otro lado *T. harzianum* puede estar causando un efecto promotor sobre las raíces y sobre las comunidades microbianas a través de la liberación de metabolitos secundarios como auxinas o 6-pentyl-a-pyrone (Hermosa *et al.* 2012; Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Vinale *et al.* 2008; Harman *et al.* 2004). En los tres grupos de microorganismos la interacción de la comunidad de HMA Edo. de México individual o en combinación con las cepas de *Trichoderma* no causó un efecto sobre estas poblaciones, pero su abundancia fue mayor

comparada con las plantas control o aquellas solo inoculadas con las cepas de *T. viride* o Tricsoil. La abundancia en el suelo de los tres grupos de microorganismos se ve estimulada cuando está en combinación la comunidad nativa Michoacán con las cepas de *Trichoderma*, lo cual podría explicarse como anteriormente se menciona debido a que los tratamientos co-inoculados con la comunidad Michoacán y las cepas de *Trichoderma* tuvieron un mayor desarrollo radicular. Sin embargo, caso contrario sucedió con el inóculo Guanajuato el cual en combinación con las cepas de *T. harzianum* y *T. viride* disminuyen la abundancia del microorganismo, esto puede deberse a que la abundancia de estas dos cepas fue mayor comparadas con la cepa de Tricsoil lo cual se asocia a que una mayor abundancia genera una mayor competencia por los nutrientes en la rizosfera. El perfil de ácidos grasos de hongos totales, que en su mayoría de acuerdo a los valores obtenidos está representado por los HMA mostró que la abundancia está relacionada con el tipo de inóculo de HMA y que la interacción con las cepas de *Trichoderma* no afecta el desarrollo del micelio extraradical. Dichos datos concuerdan con los resultados de colonización antes mencionados y discutidos. Finalmente, en base a los resultados de los ácidos grasos la abundancia de la población nativa de Michoacán incrementa cuando están presentes las cepas de *Trichoderma*.

En general, en ambos ensayos se observaron diferentes respuestas debido a la interacción entre las comunidades nativas de HMA y las cepas de *Trichoderma*. Tales respuestas pudieron diferir por varios aspectos entre ellos que se utilizaron diferentes variedades de maíz y, por otro lado, ambos experimentos se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones experimentales y por tanto las respuestas de los microorganismos varía considerablemente.

Resulta complejo explicar las múltiples interacciones en el suelo, ya que estas dependen de factores como el tipo de suelo, la planta hospedera, las especies que participan en la interacción por lo que no puede generalizarse un efecto benéfico o negativo cuando interactúan dos o más microorganismos.

8 CONCLUSIONES

La colonización micorrízica no es afectada por la presencia de ninguna de las cepas de *Trichoderma* evaluadas en estos experimentos.

La presencia de la comunidad nativa Michoacán reducen la densidad de las cepas *Trichoderma* en el suelo una vez establecida la simbiosis, mientras que el inóculo Edo. de México reduce la cantidad de *T. harzianum* en el suelo.

La abundancia de las diversas comunidades de microorganismos no se ve afectada por la interacción de los HMA y las cepas de *Trichoderma*.

La interacción entre comunidades nativas de HMA con diversas cepas de *Trichoderma* tiene un efecto neutral sobre el crecimiento de las plantas maíz. El crecimiento principalmente fue influenciado negativa o positivamente dependiendo de la variedad de maíz y del inóculo micorrízico.

9 REFERENCIAS

- Allen M.F.** (1996). "The Ecology of Arbuscular Mycorrhizas: A Look back into the 20th Century and a Peek into the 21st." *Mycological Research* 100 (7): 769–82. doi:10.1016/S0953-7562(96)80021-9.
- Atanasova L.** (2014). "Ecophysiology of Trichoderma in Genomic Perspective". En *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier, Amsterdam. Pages 25-40, doi:10.1016/B978-0-444-59576-8.00002-3.
- Auge R.M.** (2001). "Water Relations, Drought and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis." *Mycorrhiza*. doi: 10.1007/s005720100097.
- Avis T.J, Gravel V, Antoun H, y Tweddell R.J.** (2008). "Multifaceted Beneficial Effects of Rhizosphere Microorganisms on Plant Health and Productivity." *Soil Biology and Biochemistry* 40 (7): 1733–40. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.02.013.
- Azcón-Aguilar C, Jaizme-Vega M.C, y Calvet C.** (2002). "The Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi to the Control of Soil-Borne Plant Pathogens." En *Mycorrhizal Technology in Agriculture*, 187–97. Birkhäuser Basel. doi:10.1007/978-3-0348-8117-3_15
- Bago B, Azcón-Aguilar C.** (1997). "Changes in the rhizospheric pH induced by arbuscular mycorrhiza formation in onion (*Allium cepa* L)". *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.*, 160: 333–339. doi: 10.1002/jpln.19971600231.
- Bais H.P, Weir T.L, Perry L.G, Gilroy S, y Vivanco J.M.** (2006). "The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms." *Annual Review of Plant Biology* 57: 233–66. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.
- Bais H.P, Park S.W, Weir T.L, Callaway R.M, y Vivanco J.M.** (2004). "How Plants Communicate Using the Underground Information Superhighway." *Trends in Plant Science* 9 (1): 26–32. doi:10.1016/j.tplants.2003.11.008.

- Barea J.M, Ferrol N, Azcón-Aguilar C y Azcón R.** (2008). "The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions. Mycorrhizal symbioses Series: *Plant Ecophysiology*, vol. 7. Springer. pp. 143-163.
- Barea J.M, Pozo M-J, Azcón R, y Azcón-Aguilar C.** (2013). "Microbial Interactions in the Rhizosphere." En *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 29–44. doi:10.1002/9781118297674.ch4.
- Barea J.M, Azcón R, y Azcón-Aguilar C.** (2005). "Interactions Between Mycorrhizal Fungi and Bacteria to Improve Plant Nutrient Cycling and Soil Structure." En *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* SE - 10, 3:195–212. Soil Biology. Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/3-540-26609-7_10.
- Bedini S, Pellegrino E, Avio L, Pellegrini S, Bazzoffi P, Argese E, y Giovannetti M.** (2009). "Changes in Soil Aggregation and Glomalin-Related Soil Protein Content as Affected by the Arbuscular Mycorrhizal Fungal Species *Glomus Mosseae* and *Glomus Intraradices*." *Soil Biology and Biochemistry* 41 (7): 1491–96. doi:10.1016/j.soilbio.2009.04.005.
- Benitez T, Limon C, Delgado-Jarana J. y Re M.** (1998). *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2. 101–127 Taylor and Francis, London.
- Brunner K, Peterbauer C.K, Mach R-L, Lorito M, Zeilinger S, y Kubicek C.P.** (2003). "The Nag1 N-Acetylglucosaminidase of *Trichoderma Atroviride* Is Essential for Chitinase Induction by Chitin and of Major Relevance to Biocontrol." *Current Genetics* 43 (4): 289–95. doi:10.1007/s00294-003-0399-y.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, y Bécard G.** (2000). "The Pre-Symbiotic Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Is Induced by a Branching Factor Partially Purified from Plant Root Exudates." *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 13 (6): 693–98. doi:10.1094/MPMI.2000.13.6.693.
- Calvet C, Pera J, y Barea J.M.** (1993). "Growth-Response of Marigold (*Tagetes Erecta* L) To Inoculation With *Glomus-Mosseae*, *Trichoderma-Aureoviride*

and Pythium-Ultimum in a Peat-Perlite Mixture.” *Plant and Soil* 148: (1–6). doi:10.1007/bf02185378.

Cano M.A. (2011). “interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, Trichoderma Spp . Y Pseudomonas”. *Revista. U.D.C.A Actualidad & divulgación científica*. 14: 15–31.

Cavagnaro T.R, Barrios-Masias F.H, y Jackson L.E. (2012). “Arbuscular Mycorrhizas and Their Role in Plant Growth, Nitrogen Interception and Soil Gas Efflux in an Organic Production System.” *Plant and Soil* 353 (1-2):181–94. doi:10.1007/s11104-011-1021-6.

Cavagnaro T.R. (2008). “The Role of Arbuscular Mycorrhizas in Improving Plant Zinc Nutrition under Low Soil Zinc Concentrations: A Review.” *Plant and Soil* 304 (1-2): 315–25. doi:10.1007/s11104-008-9559-7.

Chandanie W.A, Kubota M, y Hyakumachi M. (2009). “Interactions between the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus Mosseae and Plant Growth-Promoting Fungi and Their Significance for Enhancing Plant Growth and Suppressing Damping-off of Cucumber (Cucumis Sativus L.)” *Applied Soil Ecology* 41 (3): 336–41. doi:10.1016/j.apsoil.2008.12.006.

Contreras-Cornejo H-A, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, y López-Bucio J. (2009). “Trichoderma Virens, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in Arabidopsis.” *Plant Physiology* 149 (3): 1579–92. doi:10.1104/pp.108.130369.

Cornejo P, Meier S, Borie G, Rillig M.C y Borie F. (2008). “Glomalin-Related Soil Protein in a Mediterranean Ecosystem Affected by a Copper Smelter and Its Contribution to Cu and Zn Sequestration.” *The Science of the Total Environment* 406 (1-2): 154–60. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.07.045.

Datnoff L.E, Nemeč S, y Pernezny K. (1995). “Biological Control of Fusarium Crown and Root Rot of Tomato in Florida Using Trichoderma Harzianum and

Glomus Intraradices.” *Biological Control* 5 (3): 427–31.
doi:10.1006/bcon.1995.1051.

Elad Y, Chet I. y Henis Y. (1981). “A selective medium for improving quantitative insolation of *Trichoderma* spp. from soil”. *Phytoparasitica* 9(1): 56-67.

Facelli E, Smith S.E, Facelli J.M, Christophersen H.M, y Smith F.A. (2010). “Underground Friends or Enemies: Model Plants Help to Unravel Direct and Indirect Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Plant Competition.” *New Phytologist* 185 (4): 1050–61. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03162.x.

FAO Plant Production and Protection Series (2001). “El maíz en los trópicos”. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-x7650s/x7650s02.htm> .

Fernández R, Morales L.A, y Gálvez A. (2016). “Importancia de Los Maíces Nativos de México En La Dieta Nacional: Una Revisión Indispensable.” *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 275–83.

Filion M, St-arnaud M, y Fortin J.A. (1999). “Direct Interaction between the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus* Intraradices and Different Rhizosphere Microorganisms.” *New Phytologist*. 525–33.

Fracchia S, García-Romera I, Godeas A, y Ocampo J.A. (2000). “Effect on the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials”. *Plant Soil*. 223: 175-184.

Gianinazzi S, Gollotte A, Binet M.N, Tuinen D.V, Redecker D, y Wipf D. (2010). “Agroecology: The Key Role of Arbuscular Mycorrhizas in Ecosystem Services.” *Mycorrhiza* 20 (8): 519–30. doi:10.1007/s00572-010-0333-3.

Gianinazzi-Pearson V, Lemoine M.C, Arnould C, Gollotte A, y Morton J.B. (1994). “Localization of β 1–3 glucans in spore and hyphal walls of fungi in the Glomales”. *Mycologia* 86, 478–485.

- Giovannetti M, y Citernesi A.S.** (1993). "Time-Course of Appressorium Formation on Host Plants by Arbuscular Mycorrhizal Fungi." *Mycological Research* 97 (9): 1140–42. doi:10.1016/S0953-7562(09)80517-0.
- Giovannetti, M., Y B. Mosse.** (1980). "An Evaluation Of Techniques For Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection In Roots." *New Phytologist* 84 (3): 489–500. doi:10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x.
- Grace E.J, Cotsaftis O, Tester M, Smith F.A, y Smith S.E.** (2009). "Arbuscular Mycorrhizal Inhibition of Growth in Barley Cannot Be Attributed to Extent of Colonization, Fungal Phosphorus Uptake or Effects on Expression of Plant Phosphate Transporter Genes." *New Phytologist* 181 (4): 938–49. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02720.x.
- Green H, Larsen J, Olsson P.A, Jensen D.F, y Jakobsen I.** (1999). "Suppression of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* by Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* in Root-Free Soil". *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 1428–1434.
- Harman G.E, Howell C.R, Viterbo A, Chet I, y Lorito M.** (2004). "Trichoderma Species--Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts." *Nature Reviews. Microbiology* 2 (1): 43–56. doi:10.1038/nrmicro797.
- Harman G.E, Lorito M, y Lynch J.M. (2004b).** "Uses of *Trichoderma* Spp. to Alleviate or Remediate Soil and Water Pollution." *Advances in Applied Microbiology*: 313–30. doi:10.1016/S0065-2164(04)56010-0.
- Harrier L.A, y Watson C.A.** (2004). "The Potential Role of Arbuscular mycorrhizal(AM) Fungi in the Bioprotection of Plants against Soil-Borne Pathogens in Organic And/or Other Sustainable Farming Systems." *Pest Management Science* 60 (2): 149–57. doi:10.1002/ps.820.
- Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, y Ahmed I.** (2010). "Soil Beneficial Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion: A Review." *Annals of Microbiology* 60 (4): 579–98. doi:10.1007/s13213-010-0117-1.

- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E.** (2012). "Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes". *Microbiology*. 158(1):17-25 doi:10.1099/mic.0.052274-0.
- Hodge A, y Fitter A.H.** (2010). "Substantial Nitrogen Acquisition by Arbuscular Mycorrhizal Fungi from Organic Material Has Implications for N Cycling." *PNAS*. doi:10.1073/pnas.1005874107/pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005874107.
- Ibarra-Medina V.A, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A, Lara-Hernández M.E, y Valdez-Carrasco J.M.** (2016). "Isolation and Screening of Trichoderma Strains Antagonistic to Sclerotinia Sclerotiorum and Sclerotinia Minor." *Revista Mexicana de Micología* 31: 53–63.
- Infante D, Martínez B, Gonzales M, y Reyes Y.** (2009). "Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos". *Revista de Protección Vegetal. La Habana, Cuba*. 24 (1): 14-21.
- Jakobsen I, Abbott L.K, y Robson A.D.** (1992). "External Hyphae of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Trifolium Subterraneum L.. 1. Spread of Hyphae and Phosphorus Inflow into Roots." *New Phytologist*. 120 (3): 371–80. doi:10.1111/j.1469-8137.1992.tb01077.x.
- Kaepler S.M, Parke J.L, Mueller S.M, Senior L., Stuber C., y Tracy W.F.** (2000). "Variation among Maize Inbred Lines and Detection of Quantitative Trait Loci for Growth at Low Phosphorus and Responsiveness to Arbuscular Mycorrhizal Fungi" *Crop Science*. 40:358-364.
- Kubicek C.P, y Harman G.E.** (1998). "Trichoderma and Gliocladium Basic biology, taxonomy and genetics vol. 1" Laylor & Francis Ltd., London, UK ISBN 0-7484-0572-0.
- Lemoine M.C, Gollotte A, y Gianinazzi-Pearson V.** (1995). "Localization of Beta (1-3) Glucan in Walls of the Endomycorrhizal Fungi Glomus Mosseae (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe and Acaulospora Laevis Gerd. & Trappe during

Colonization of Host Roots.” *New Phytologist* 129 (1): 97–105. doi:10.1111/j.1469-8137.1995.tb03013.x.

Liu A, Hamel C, Hamilton R.I, Ma B.L, y Smith D.L. (2000). “Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by Mycorrhizal Maize (*Zea Mays* L.) Grown in Soil at Different P and Micronutrient Levels.” *Mycorrhiza* 9 (6): 331–36. doi:10.1007/s005720050277.

Lopez-Bucio, J. (2002). “Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the Arabidopsis Root System.” *Plant Physiology*. 129 (1): 244–56. doi:10.1104/pp.010934.

Lorito M, Woo S.L, Harman G.E, y Monte E. (2010). “Translational Research on Trichoderma: From 'Omics to the Field.” *Annual Review of Phytopathology* 48: 395–417. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114314.

Martínez A, Obertello M, Pardo A, Ocampo J.A, y Godeas A. (2004). “Interactions between Trichoderma Pseudokoningii Strains and the Arbuscular Mycorrhizal Fungi Glomus mosseae and Gigaspora rosea.” *Mycorrhiza* 14 (2): 79–84. doi:10.1007/s00572-003-0240-y.

Martínez-Medina A, Roldán A, Albacete A, y Pascual J.A. (2011). “The Interaction with Arbuscular Mycorrhizal Fungi or Trichoderma Harzianum Alters the Shoot Hormonal Profile in Melon Plants.” *Phytochemistry* 72 (2-3): 223–29. doi:10.1016/j.phytochem.2010.11.008.

Martínez-Medina A, Roldán A, y Pascual J.A. (2011). “Interaction between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Trichoderma Harzianum under Conventional and Low Input Fertilization Field Condition in Melon Crops: Growth Response and Fusarium Wilt Biocontrol.” *Applied Soil Ecology* 47: 98–105. doi:10.1016/j.apsoil.2010.11.010.

Martínez-Medina A, Pascual J.A, Lloret E, y Roldán A. (2009). “Interactions between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Trichoderma Harzianum and Their Effects on Fusarium Wilt in Melon Plants Grown in Seedling Nurseries.”

Journal of the Science of Food and Agriculture 89 (11): 1843–50.
doi:10.1002/jsfa.3660.

Mastouri F, Björkman T, y Harman G.E. (2010). “Seed Treatment with *Trichoderma Harzianum* Alleviates Biotic, Abiotic, and Physiological Stresses in Germinating Seeds and Seedlings.” *Phytopathology* 100 (11): 1213–21.
doi:10.1094/PHYTO-03-10-0091.

McAllister C.B, García-Romera I, Godeas A, y Ocampo J.A. (1994). “Interactions between *Trichoderma Koningii*, *Fusarium Solani* and *Glomus Mosseae*: Effects on Plant Growth, Arbuscular Mycorrhizas and the Saprophyte Inoculants.” *Soil Biology and Biochemistry* 26 (94): 1363–67.
doi:10.1016/0038-0717(94)90218-6.

Morgan J.A, Bending G.D, y White P.J. (2005). “Biological Costs and Benefits to Plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere.” *Journal of Experimental Botany* 56 (417): 1729–39. doi:10.1093/jxb/eri205.

Mosse B. (1973). “Advances in the Study of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza.” *Annual Review of Phytopathology* 11 (1). 171–96.
doi:10.1146/annurev.py.11.090173.001131.

Mukherjee P.K, Horwitz B.A, Singh U.S, Mukherjee M y Schmoll M. (2013).” *Trichoderma in Agriculture, Industry and Medicine: An Overview*”. En *Trichoderma: biology and applications*. doi 10.1079/9781780642475.0001 pp. 1-9.

Mycobank, <http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Home>.

National Center for Biotechnology Information.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=trichoderma>.

Newton A.C, Fitt B.D, Atkins S.D, Walters D.R, y Daniell T.J. (2010). “Pathogenesis, Parasitism and Mutualism in the Trophic Space of Microbe-Plant Interactions.” *Trends in Microbiology* 18 (8): 365–73.
doi:10.1016/j.tim.2010.06.002.

- Parniske M.** (2008). "Arbuscular Mycorrhiza: The Mother of Plant Root Endosymbioses." *Nature Reviews. Microbiology* 6 (10). Nature Publishing Group: 763–75. doi:10.1038/nrmicro1987.
- Phillips J.M, y Hayman D.S.** (1970). "Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection". *Transactions of the British Mycological Society.* 55, 158–IN18.
- Reynolds H.L, Hartley A.E, Vogelsang K.M, Bever J.D, y Schultz P.A.** (2005). "Arbuscular Mycorrhizal Fungi Do Not Enhance Nitrogen Acquisition and Growth of Old-Field Perennials under Low Nitrogen Supply in Glasshouse Culture." *The New Phytologist* 167 (3): 869–80. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01455.x.
- Richardson A.E., Lynch J.P, Ryan P.R, Delhaize E, Smith F.A, Smith S.E, Harvey P.R, et al.** (2011). "Plant and Microbial Strategies to Improve the Phosphorus Efficiency of Agriculture." *Plant and Soil* 349 (1-2): 121–56. doi:10.1007/s11104-011-0950-4.
- Rillig, M.C, Wright S.F, y Eviner V.T.** (2002). "The Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Glomalin in Soil Aggregation: Comparing Effects of Five Plant Species." *Plant and Soil* 238 (2): 325–33. doi:10.1023/a:1014483303813.
- Samuels G.J.** (1996). "Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus". *Mycological Research*, 100(8), 923-935.
- Schirmbock M, Lorito M, Wang Y.L, Hayes C.K, Arisan-Atac I, Scala F, Harman G.E, y Kubicek C.P.** (1994). "Parallel Formation and Synergism of Hydrolytic Enzymes and Peptaibol Antibiotics, Molecular Mechanisms Involved in the Antagonistic Action of Trichoderma Harzianum against Phytopathogenic Fungi." *Applied and Environmental Microbiology.* 60 (12): 4364–70.
- Shane M.W, y Lambers H.** (2005). "Cluster Roots: A Curiosity in Context." *Plant and Soil* 274 (1-2): 101–25. doi:10.1007/s11104-004-2725-7.

- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera** (2011) Cierre de la producción agrícola por cultivo. Disponible en:
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=215.
- Smith S.E, Smith F.A, y Jakobsen I.** (2003). "Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses). *Plant physiology* 16–20. doi:10.1104/pp.103.024380.We.
- Smith S.E, y Smith F.A.** (2012). "Fresh Perspectives on the Roles of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Nutrition and Growth." *Mycologia* 104 (1): 1–13. doi:10.3852/11-229.
- Smith S.E. y Read D.** (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Third edit. New York: Elsevier.
- Sosa Rodríguez T, Sánchez Nieves J, Morales Gutiérrez E, Cruz Cortés F.** (2006). "Interacción micorrizas arbusculares-Trichoderma harzianum (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de Brachiaria decumbens (Poaceae)". *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 11 No. 1, 45.
- Sunita K, Kumar A, Aggarwal A, Parkash V.** (2012). "Influence of Inoculation with the Endomycorrhizal Fungi and Trichoderma Viride on Morphological and Physiological Growth Parameters of Rauwolfia Serpentina Benth. Ex. Kurtz." *Indian Journal of Microbiology* 52 (2): 295–99. doi:10.1007/s12088-011-0215-1.
- Tawaraya, K, Naito M, y Wagatsuma T.** (2006). "Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphate by Hyphal Exudates of Arbuscular Mycorrhizal Fungi." *Journal of Plant Nutrition* 29 (4): 657–65. doi:10.1080/01904160600564428.
- Turrent-Fernández A, Wise T.A, Garvey E.** (2012). Factibilidad de alcanzar el potencial productivo de maíz de México. *Mexican Rural Development Research Reports*. 24:1-36.

- Van Aarle I.M, y Olsson P.A.** (2003). "Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi". *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6762–6767.
- Vance C.P.** (2008). "Plants without Arbuscular Mycorrhizae." En *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions SE- 6*, edited by Philip J. White and John P. Hammond, 7:117–42. *Plant Ecophysiology*. doi:10.1007/978-1-4020-8435-5_6.
- Vázquez M.M, César S, Azcón R, y Barea J.M.** (2000). "Interactions between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Other Microbial Inoculants (Azospirillum, Pseudomonas, Trichoderma) and Their Effects on Microbial Population and Enzyme Activities in the Rhizosphere of Maize Plants." *Applied Soil Ecology* 15 (3): 261–72. doi:10.1016/S0929-1393(00)00075-5.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E.L, Marra R, Woo S.L, y Lorito M.** (2008). "Trichoderma-Plant-Pathogen Interactions." *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1–10. doi:10.1016/j.soilbio.2007.07.002.
- Wafaa M.H, Abdel-latif, Faten M.** (2001). "Interaction Between Vascular Arbuscular Mycorrhizae and Antagonistic Biocontrol Micro-organisms on Controlling Root-rot Disease Incidence of Geranium Plants". *Journal of Biological Sciences*, 1: 1147-1153.
- Weissenhorn I, y Leyval C.** (1995). "Root Colonization of Maize by a Cd-Sensitive and a Cd-Tolerant Glomus Mosseae and Cadmium Uptake in Sand Culture." *Plant and Soil* 175: 233–38. doi:10.1007/BF00011359.

10 ANEXOS

ANEXO 1

Morfotipos de las comunidades nativas de hongos micorrízicos arbusculares

Inóculo Guanajuato	Inóculo Michoacán	Inóculo Edo. de México
<i>Diversispora sp.</i>	<i>Acaulospora rehmsii</i>	<i>Acaulospora delicata</i>
<i>Funneliformis mosseae</i>	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	<i>Acaulospora laevis</i>
<i>Gigaspora decipiens</i>	<i>Acaulospora spinosa</i>	<i>Acaulospora rehmsii</i>
<i>Gigaspora margarita</i>	<i>Acaulospora splendida</i>	<i>Acaulospora splendida</i>
<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>Diversispora spurca</i>	<i>Ambispora leptoticha</i>
	<i>Funneliformis mosseae</i>	<i>Claroideoglosum aff. claroideum</i>
	<i>Gigaspora aff. albida</i>	<i>Claroideoglosum lamellosum</i>
	<i>Gigaspora decipiens</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>
	<i>Gigaspora aff. decipiens</i>	<i>Gigaspora albida</i>
	<i>Pacispora aff. franciscana</i>	<i>Paraglosum occultum</i>
	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>Scutellospora cerradensis</i>
	<i>Scutellospora calospora</i>	<i>Scutellospora dipurpurescens</i>
	<i>Scutellospora dipurpurescens</i>	

ANEXO 2

Características físicas, reacción y fertilidad del suelo

<i>Características físicas y reacción del suelo</i>	
Arena	19.48 %
Arcilla	53.24 %
Limo	27.28 %
Tipo de suelo	Arcilla
Punto de saturación	50 %
Capacidad de campo	37.5 %
Punto March. Perm.	19.7 %
Densidad Aparente	1.17 g/cm ³
pH (1:2 agua)	7.28 (Neutro)
Carbonatos totales	1.46 %

<i>Fertilidad</i>	
Materia orgánica (%)	2.74
Nitrógeno inorgánico (ppm)	23.2
Fósforo-Bray (ppm)	5.8
Potasio (ppm)	303
Calcio (ppm)	2985
Magnesio (ppm)	709
Sodio (ppm)	192
Hierro (ppm)	76.2
Zinc (ppm)	5.37
Manganeso (ppm)	50.5
Cobre (ppm)	1.97

ANEXO 3

Soluciones nutritivas aplicadas

Solución	Componentes	Fórmula	Aplicación		
			Concentración (g/l)	mg/kg de sustrato	ml/ kg de sustrato
1	Sulfato de potasio	K_2SO_4	25.0	75.0	3
2	Cloruro de calcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	* 25.0	75.0	3
3	Sulfato de cobre heptahidratado	$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	* 0.7	2.1	3
	Sulfato de zinc heptahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	* 1.8	5.4	
	Sulfato de magnesio hidratado	$MnSO_4 \cdot H_2O$	3.5	10.5	
	Sulfato de Cobalto heptahidratado	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	* 0.13	0.39	
	Sulfato de manganeso heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	* 15.0	45.0	
	Molibdato de sodio dihidratado	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.06	0.18	
4	Nitrato de amonio	NH_4NO_3	28.57 (10 mg N/ml)	86.2	3.75

ANEXO 4

Reactivos para la extracción de ácidos grasos

Reagente	Composición
Reactivo 1: Saponificación	45 g hidróxido de sodio 150 ml metano 150 ml agua destilada
Reactivo 2: Metilación	325 ml ácido clorhídrico 6N 275 ml metanol
Reactivo 3: Extracción	200 ml hexano 200 ml metil tert-butil éter (MTBE)
Reactivo 4: Lavado básico	10.8 g hidróxido de sodio 900 ml agua destilada

ANEXO 5

Colonización micorrízica

