



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS TABASCO**

**POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL  
TRÓPICO**

**PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A PARTIR DE  
HMA PARA EL CULTIVO DE MAÍZ EN SUELOS DE SABANA**

**MATEO OSORIO MIRANDA**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, DICIEMBRE

2011



La presente tesis titulada: PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A PARTIR DE HMA PARA EL CULTIVO DE MAÍZ EN SUELOS DE SABANA, realizada por el alumno: MATEO OSORIO MIRANDA, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN  
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

---

DR. MEPIVOSETH CASTELÁN ESTRADA

ASESOR:

---

DR. SERGIO SALGADO GARCÍA

ASESOR:

---

MC. LAURA V. HERNÁNDEZ CUEVAS

ASESOR

---

DR. GREGORIO ARELLANO OSTOA

H. Cárdenas, Tabasco, México, 15 de Diciembre de 2011

# PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE A PARTIR DE HMA PARA EL CULTIVO DE MAÍZ EN SUELOS DE SABANA

Mateo Osorio Miranda, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2011

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de seleccionar un consorcio de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) para producir un biofertilizante destinado al maíz cultivado en suelos de sabana. En un estudio previo se caracterizaron y clasificaron taxonómicamente HMA asociados al maíz en suelos de sabana en Tabasco. A partir de estas cepas se obtuvieron cinco consorcios que fueron evaluados en el presente estudio mediante la prueba del Número más Probable de Propágulos, seleccionando los tres consorcios más efectivos. Estos fueron propagados en diferentes sustratos para determinar el más adecuado para formular el biofertilizante. Los sustratos ensayados fueron: Cachaza Compostada y suelos Fluvisol y Acrisol, estériles y no estériles, en un diseño de bloques al azar con 20 repeticiones. La respuesta de los consorcios se evaluó mediante la producción de esporas (número de esporas por 100 g de suelo) y el porcentaje de raíces colonizadas. En una etapa posterior se evaluaron en campo sobre maíz VS-536 los tres consorcios más prometedores, junto con un inoculante comercial, fertilización química y un testigo absoluto. Nuestros resultados muestran que el Consorcio 2 indujo mayor rendimiento de maíz en campo ( $1147.9 \text{ kg ha}^{-1}$ ) superando al inoculante comercial ( $824 \text{ kg ha}^{-1}$ ) y al testigo absoluto ( $711.5 \text{ kg ha}^{-1}$ ). El rendimiento de maíz favorecido por el C2 fue superado solo por la fertilización química ( $2097.4 \text{ kg ha}^{-1}$ ).

*Palabras claves: HMA, Maíz, Inoculantes, Consorcios, Biofertilizante, Rendimiento.*

# A BIOFERTILIZER PRODUCTION FROM AMF FOR MAIZE CROP SAVANNA SOILS

Mateo Osorio Miranda, M.C.  
Colegio Postgraduados, 2011

## **ABSTRACT**

This study was conducted with the objective of selecting a consortium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to produce a bio-fertilizer for corn grown in savanna soils. In a previous study were characterized and classified taxonomically associated with corn HMA savanna soils in Tabasco. From these strains were obtained five consortiums were evaluated in this study by testing the most probable number of propagules, selecting the three most effective consortia. These were propagated on different substrates to determine the most appropriate to develop the biofertilizer. The substrates tested were: Cachaça Fluvisol compost, and soils and purified, sterile and non sterile, in a randomized block design with 20 repetitions. The response of the consortia was evaluated by producing spores (number of spores per 100 g of soil) and percentage of roots colonized. At a later stage were evaluated in field corn VS-536 on the three most promising consortia, along with a commercial inoculant, chemical fertilizers and absolute control. Our results show that the Consortium 2 induced higher yield of corn in the field (1147.9 kg ha<sup>-1</sup>) beating the commercial inoculant (824 kg ha<sup>-1</sup>) and the absolute control (711.5 kg ha<sup>-1</sup>). Maize yield was favored by the C2 surpassed only by chemical fertilization (2097.4 kg ha<sup>-1</sup>).

Keywords: AMF, Maize, inoculants, Consortia, Biofertilizers, Yield corn.

## **DEDICATORIA**

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

**A DIOS**, Por darme la fortaleza, salud y sabiduría para poder terminar con una más de mis metas más grande de mi vida.

**GRACIAS A MIS PADRES ESTEBAN Y NATIVIDAD**, por su confianza y apoyo incondicional que fue fundamental para la realización de este trabajo y por acompañarme en esta aventura que significó la maestría y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos esta tesis es suya.

**A MIS HERMANOS DEYVI Y ANAYELI**, que siempre han estado apoyándome y porque gracias a ellos siempre he contado con esa mano amiga y sincera gracias por su comprensión los quiero mucho.

**A TI CRISTABEL**, porque has estado junto a mí en cada uno de los momentos de mi vida te amo.

**A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS**, por su apoyo en la realización de este trabajo.

**AL DR Mepivoseth Castelán Estrada**, por su amistad y apoyo en la realización de este trabajo gracias Doctor por todo le estoy muy agradecido por cada uno de sus consejos, la meta está cumplida.

**AL DR Sergio Salgado García**, por su asesoría en la revisión y sugerencias en la redacción de este trabajo y sus valiosos consejos que me proporciono en el transcurso de la realización de este trabajo.

**A LA MAESTRA Laura V. Hernández Cuevas**, por sus consejos y por su participación en la realización de este trabajo gracias maestra.

**AL DR Gregorio Arellano Ostoa**, por su apoyo, comprensión y consejos para La redaccion de este trabajo.

**AL DR Juan Florêncio Gomez Leyva**, por la amistad brindada y por cada una de sus consejos que fueron fundamentales en la terminación de este trabajo.

Y en general a todas aquella personas que de una forma u otra me apoyaron para realización de este trabajo y el cual gracias a su apoyo se logro terminar muchas gracias.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de Maestría en Ciencias se llevó a cabo en el marco del proyecto **“MICO-MAIZ: un Biofertilizante para el Maíz Cultivado en Suelos Ácidos de Tabasco”** Clave **TAB-2009-C17-121501**. Dicho proyecto se realizó con el apoyo financiero de los Fondos Mixtos CONACYT-Gobierno del Estado de Tabasco, siendo el responsable técnico del mismo el Dr. Mepivoseh Castelán Estrada.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT .....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS .....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1 Clasificación de las Micorrizas Arbusculares .....	6
2.2. Establecimiento de la Simbiosis.....	9
2.3. Importancia de los HMA en el Suelo .....	12
2.4. Los HMA en la Agricultura .....	15
2.5. Uso de Inoculantes Micorriza–Maíz .....	17
2.6. Número más Probable de Propágulos .....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Número más Probable de Propágulos .....	22
3.2. Producción del Inóculo .....	25
3.3. Prueba Piloto en Campo .....	29
3.4. Extracción y Purificación de ADN de Esporas .....	32
3.5. Diseños Experimentales y Análisis Estadísticos .....	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1. Número más Probable de Propágulos .....	37
4.2. Producción de Inoculantes.....	39
4.3. Evaluación de Inoculantes en Parcelas Experimentales en Campo.....	42
4.4. Caracterización Molecular.....	46
CONCLUSIONES.....	51
LITERATURA CITADA.....	53

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación actual de los HMA .....	8
<b>Cuadro 2.</b> Preparación de diluciones para evaluar el número más probable (NMP) de propágulos infectivos de hongos micorrizógenos arbusculares. ....	24
<b>Cuadro 3.</b> Pruebas para la producción de inoculantes micorrícicos empleando diferentes sustratos para reproducir consorcios de HMA. ....	28
<b>Cuadro 4.</b> Distribución de los tratamientos para evaluar el efecto de inoculantes micorrícicos sobre maíz VS-536 en un suelo de sabana en Huimanguillo, Tabasco.....	30
<b>Cuadro 5.</b> Dosis de inoculantes y fertilizante químico sobre maíz VS-536 para evaluar la respuesta de 3 consorcios de HMA en un suelo de sabana en Tabasco. ....	31
<b>Cuadro 6.</b> Número de esporas /100 g de suelo y Número más Probable de Propágulos, encontrados en los consorcios micorrícicos de suelos de sabana de Tabasco. ....	38
<b>Cuadro 7.</b> Respuesta de tres sustratos a la propagación de HMA sobre producción de esporas y colonización de raíces de maíz. ....	40
<b>Cuadro 8.</b> Número de esporas en 100 g de suelo en parcelas experimentales de maíz VS-536 inoculado con consorcios de HMA en suelos de sabana, en Tabasco. ....	43
<b>Cuadro 9.</b> Rendimiento de parcelas experimentales de maíz VS-536 inoculado con consorcios de HMA en suelos de sabana, en Tabasco (kg ha <sup>-1</sup> ). ....	45
<b>Cuadro 10.</b> Alineamientos significativos de secuencias de ADNr de HMA con respecto a otras especies fúngicas.....	49
<b>Cuadro 11.</b> Rama taxonómica de las especies que se alinearon de acuerdo al programa BLAST.....	50

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización geográfica de los sitios de muestreo de HMA en las cinco sabanas de Tabasco, 2008.....	23
Figura 2. Especies de HMA identificadas en suelos de las sabanas de Tabasco, que conforman los consorcios evaluados en campo sobre maíz VS-536.....	26
Figura 2. Continuación .....	27
Figura 3. Aspectos de la parcela experimental del Ejido Central Fournier, cultivada con maíz VS-536 inoculado con consorcios de HMA en suelos de sabana, en Tabasco.....	44
Figura 4. Marcador de talla molecular rango de separación 100-2000pb, tamaño de los fragmentos 550pb Productos de amplificación por PCR de la región de ADNr.....	46

## 1. INTRODUCCIÓN

En suelos de baja fertilidad, las plantas desarrollan estrategias de tolerancia les permiten adaptarse a condiciones edáficas desfavorables, con base en su eficiencia para la adquisición de nutrimentos (Azcón y Barea., 1980; Harley., 1989). Entre las estrategias se encuentran, por un lado, su eficiencia nutrimental, definida como la capacidad de las plantas para producir la mayor cantidad de biomasa seca por unidad de nutrimento suministrado, por otro, las relaciones entre hongos del suelo y las raíces, que forman asociaciones simbióticas llamadas micorrizas (Marschner., 1991, 1995; Barea., 1998; Portilla *et al.*, 1998).

La micorriza arbuscular es una asociación endosimbiótica, lo que significa que el “hongo” invade el interior de la raíz. El término, que proviene de los vocablos griego *miko* = hongo y *rizos* = raíz (significa literalmente “raíz fúngica”). Fue empleado por primera vez por Frank en 1885 (Allen., 1991). Esta asociación se considera un carácter ancestral de las especies vegetales, ya que se han encontrado registros fósiles en plantas del Devónico 460 millones de años aproximadamente. Su presencia fue fundamental en el proceso de colonización del medio terrestre por parte de las plantas a mediados del siglo XX cuando toma importancia el beneficio de estas asociaciones en la naturaleza, así como su presencia en casi todas las asociaciones suelo-planta (Barea y Jeffries., 1995). Los HMA se reporta en más de 200 familias y más de 1,000 géneros de plantas, distribuidas en el grupo de las Briofitas, Pteridofitas, Angiospermas y Gimnospermas, dentro de las cuales se incluyen muchas especies de cultivos importantes en la agricultura (Daniell *et al.*, 2001), principalmente en gramíneas y leguminosas. Este tipo de asociación es de suma importancia en más del 92% de las plantas terrestres formando diferentes tipos de asociaciones micorrízicas, aunque el número total de hongos del suelo involucrados en esta simbiosis es desconocido, los HMA han beneficiado muchas especies importantes, como el maíz, al incrementar su adaptación a diferentes ambientes y con resultados positivos sobre la productividad del sistema (Lanfranco *et al.*, 1995).

Las micorrizas facilitan la obtención de nutrimentos poco móviles como el P, incrementa la biomasa aérea y radical; aumenta la cantidad de agua absorbida (Abbott y Robson., 1991 y Sieverding., 1991). Aunque no es la única ventaja que las micorrizas proporcionan a las plantas, sino que contribuyen también a su protección frente a estreses bióticos (patógenos del suelo) y abióticos (salinidad, sequía, presencia de metales pesados) (Van Tichelen *et al.*, 2001, Azcón-Aguilar *et al.*, 2002; Ruiz-Lozano., 2003). Por su parte, la planta huésped proporciona al hongo los compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis necesarios para su desarrollo.

La colonización de las raíces por los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) ocurre mediante las esporas que germinan y también por raíces previamente colonizadas, por porciones de micelio que se encuentra en el suelo, e incluso, por otras estructuras fúngicas como por ejemplo esporas, esporocarpos, hifas extraradicales, fragmentos de raíces colonizadas (Jasper y Davy., 1993; Allen., 1995). En los suelos del trópico la densidad de esporas es baja, por lo que el micelio de los HMA es la principal fuente de inóculo (Fischer *et al.*, 1994).

En Tabasco, los suelos ácidos de la sabana ocupan el 5.17% de la superficie del estado, y los cultivos ahí establecidos en general tienen baja productividad; este es el caso del maíz que es una de las especies que más se cultiva en estos suelos. Se ha demostrado a nivel experimental que los HMA ayudan a las plantas a adquirir los nutrientes que son deficientes en suelos ácidos calcio(Ca), fosforó(P), zinc (Zn), manganeso(Mn), potasio (K), superando la limitante de acidez que restringe el crecimiento (Clark., 1997).

Dadas las limitaciones edáficas, los HMA se pueden emplear para mejorar la nutrición del maíz en suelos poco fértiles. Los HMA se caracterizan por la formación de estructuras ramificadas llamadas *arbusculos* dentro de las células del cortex radical, que aumentan la red de raíces dentro del suelo dando mayor superficie de contacto para la absorción de minerales con baja movilidad. El micelio externo forma un retículo en el suelo alrededor de la raíz (Pedraza., 1998).

Las raíces de las plantas en las que se presenta la simbiosis de los HMA, se caracterizan por ser más activas y efectivas en la captación de nutrimentos y agua del suelo que las raíces no micorrizadas (Azcón, 2000). La colonización biotrófica de la raíz por HMA provoca un desarrollo extensivo de micelio que interactúa con la raíz a través de los arbusculos, donde ocurre el intercambio nutrimental entre ambos organismos simbióticos. Estas simbiosis pueden ser aprovechadas en la agricultura para mejorar la nutrición de los cultivos y de esta manera, los rendimientos de cosecha. Algunos trabajos reportan que los HMA colonizan al maíz, entre muchos otros cultivos, y favorecen la absorción nutrimental en suelos empobrecidos.

El maíz es un cultivo básico en la dieta de las familias de México. En el Tabasco se tiene una superficie aproximada de 83,711 ha, de las cuales se obtienen 104.467 toneladas, lo que representa un rendimiento medio de 1.56 t ha<sup>-1</sup> (SIAP., 2010). Huimanguillo solo cuenta con 7,406 ha sembradas de las cuales obtiene 10,589 t, lo que corresponden 1.56 t ha<sup>-1</sup> (SIAP., 2010). Esta productividad podría ser mejorada si se emplean HMA, adaptados a los suelos de sabana para mejorar la productividad con bajo empleo de fertilizantes.

En el presente trabajo se realizó el diagnóstico de cinco consorcios extraídos de un estudio previo (Osorio *et al.*, 2008) en estos consorcios se evaluaron las variables número más probable de propágulos y número de esporas de los cuales se seleccionaron tres consorcios con los resultados de estas variables, los cuales se utilizaron para la producción de un biofertilizante para su aplicación en suelo de sabana en cultivo de maíz.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Seleccionar un consorcio de HMA cuyas especies están adaptadas a suelos de sabana para producir un biofertilizante, el cual permita mejorar el rendimiento de grano en el cultivo maíz en las sabanas de Tabasco.

### **ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la capacidad reproductiva de los HMA colectados.
2. Producir inoculantes a partir de los consorcios micorrízicos locales.
3. Evaluar en campo el efecto del inoculante sobre el rendimiento de maíz.
4. Caracterización molecularmente de las especies de HMA.

### **HIPOTESIS**

1. Al menos una cepa de las evaluadas posee capacidad infectiva sobresaliente
2. Producir al menos un inoculante de los consorcios locales de HMA
3. La aplicación del biofertilizante de HMA produce un efecto benéfico sobre el rendimiento de grano del cultivo de maíz.
4. Con las técnicas disponibles es posible caracterizar molecularmente a las morfoespecies de HMA.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

En las últimas décadas se ha intentado cambiar en el ámbito global los paradigmas de la producción agrícola que implicaban el uso intensivo de energía, maquinaria y sustancias químicas (la llamada revolución verde) por un nuevo concepto, el de la agricultura sustentable. Según ese nuevo paradigma la agricultura sustentable es un “sistema integrado de prácticas de producción vegetal y animal que a largo plazo debe, a) satisfacer las necesidades humanas de fibra y alimentos, b) mejorar la calidad ambiental y la base de recursos naturales de los cuales depende la economía agrícola, c) hacer un uso eficiente de los recursos no renovables, d) sostener la viabilidad económica de las actividades agrícolas y, e) aumentar la calidad de vida de los agricultores y de la sociedad como un todo” (Jeffries y Barea., 2001).

De tal definición puede deducirse que el uso de las micorrizas podría ser una herramienta útil para acercarnos a una agricultura orgánica. De hecho, existe una creciente conciencia ambiental gracias a la cual está aumentando la demanda de productos con certificación “orgánica”, es decir aquellos con la garantía de que durante su fase de cultivo y procesamiento no se han utilizado sustancias químicas ni artificiales.

El desarrollo histórico de los estudios de las micorrizas en México se enfocó principalmente en la asociación simbiótica que ha existido entre el hongo y raíz en la cual existe una integración fisiológica; tan es así, que es la Sociedad Mexicana de la Simbiosis Micorrízica (SOMESIMI) es la que los agrupa. En los HMA el hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, sobre la que desarrolla un micelio extenso altamente efectivo que ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales, especialmente fosfato, y agua del suelo. A su vez, la planta hospedadora proporciona nutrientes orgánicos al hongo simbiote (Azcón-Aguilar y Bago., 1994). Recientemente, varios han utilizado a las micorrizas con un enfoque más ecológico basado en el mutualismo, que es la interacción donde hay mutuos beneficios y, por lo tanto, el balance benéfico-coste es positivo; estos beneficios se reflejan en diferentes parámetros poblacionales como el incremento en la supervivencia de la planta al absorber aquellos nutrimentos

poco movibles en el suelo y en la reproducción de las especies de HMA (Guadarrama *et al.*, 2004).

En un trabajo realizado por (Lovera y Cuenca., 2007). En el cual realizaron un estudio sobre la gran diversidad de micorrizas y el potencial micorrízico que tienen en un suelo de La Gran Sabana, y una sabana perturbada adyacente, haciendo una compilación de las especies de HMA presentes a lo largo del año, en el perfil del suelo y utilizando “plantas trampas”. Los resultados muestran la existencia de una elevada diversidad de especies de HMA en la sabana natural, muchas de las cuales parecen ser especies nuevas, y señala la alta vulnerabilidad de ciertos géneros de HMA como son *Scutellospora* y *Gigaspora* ante las perturbaciones. El cambio en la composición de especies pudiera estar implicado en la escasa recuperación y el tipo de vegetación a establecerse en estas sabanas después de una severa perturbación (Lovera y Cuenca., 2007).

Es por eso que con este trabajo se busca encontrar especies de HMA adaptadas a estas condiciones y utilizarlas para la producción de un biofertilizante el cual ayude a las plantas en este caso de maíz a la mejor absorción de los nutrimentos.

## **2.1 Clasificación de las Micorrizas Arbusculares**

Las HMA son el tipo de micorriza más extendida en la naturaleza y tienen como característica principal que sus hifas penetran al interior de las células del córtex y epidermis de la raíz. Otra característica es que no forman manto en el suelo circundante. Dentro de este grupo se distinguen varios subgrupos:

1) Ericoides. En este caso, las plantas participantes en la asociación simbiótica son de la familia de las Ericáceas y los hongos pueden ser ascomicetos o basidiomicetos. La característica a destacar de los hongos que forman esta simbiosis, es su gran versatilidad en cuanto al uso de fuentes de C, N y P, ya sean de origen orgánico o no. Esta característica fúngica, confiere parte de la capacidad a las plantas que forman

este tipo de micorrizas, para crecer en suelos con un elevado contenido en materia orgánica (Pearson y Read., 1975; St-John *et al.*, 1985).

2) Orquidoides. Formadas entre plantas de la familia Orquidaceae y hongos basidiomicetos. En la fase heterótrofa del ciclo de vida de esta familia de plantas, ésta recibe compuestos carbonados a partir del hongo (Smith., 1966). Como características morfológicas del hongo, cabe destacar que tras penetrar en las células de la raíz forma ovillos dentro de la célula hospedadora previa invaginación de la membrana plasmática, así como agregados poco organizados de hifas que liberan los nutrientes cuando degeneran.

3) Arbusculares. Los hongos implicados en la formación de micorrizas arbusculares, pertenecen al phylum Glomeromycota (Shüßler *et al.*, 2001), y dicha asociación la realizan con la mayoría de las plantas terrestres (entre el 80 y el 85%) (Smith y Read., 1997). La principal característica morfológica de estos hongos es su ramificación dicotómica repetida una vez que han penetrado en las células del córtex de la raíz, para la formación de los arbusculos, estructuras típicas de la colonización de dichos hongos. Algunas especies de estos hongos forman otras estructuras en el interior de la raíz llamadas vesículas, que contienen sustancias de reserva y por las que también se ha conocido a estos hongos con el nombre de vesículo-arbusculares.

La clasificación taxonómica de los HMA (Cuadro 1) es complicada y ha sufrido numerosos cambios a lo largo de las últimas décadas. Actualmente se considera que pertenecen a la División Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001), con más de 200 especies descritas.

**Cuadro 1.** Clasificación actual de los HMA

Clase glomeromycetes		
Orden	Familia	Genero
Glomerales	Glomeraceae	Glomus
Diversisporales	Gigasporaceae	Gigaspora, Scutellospora.
	Acaulosporaceae	Acaulospora, Kuklospora
	Entrophosporaceae	Entrophospora
	Pacisporaceae	Pacispora
	Diversisporaceae	Diversispora
Paraglomerales	Paraglomeraceae	Paraglomus
Archaesporales	Geosiphonaceae	Geosiphon
	Archaeosporaceae	Archaespora, Intraspora

Fuente: realizado a partir de Schüßler *et al.*, 2001

Estos hongos formadores de micorrizas arbusculares no tienen fase de reproducción sexual, o al menos no se conoce aún, pero si son capaces de formar esporas de resistencia sobre hifas vegetativas. Dichas esporas son multinucleadas, y el número de núcleos es muy variable dependiendo del hongo en cuestión, encontrando esporas con 72 núcleos en el caso de *Scutellospora castanea* (Hosny *et al.*, 1998), y otras con hasta 2600 en el caso de especies del género *Gigaspora* (Cooke *et al.*, 1987; Bécard y Pfeffer., 1993).

El tamaño del ADN contenido en las esporas también es muy variable, dependiendo de la especie del HMA, pudiendo ir desde las 16.54 Mb de *Glomus intraradices* (Hijri y Sanders., 2004), hasta las 1058 Mb descritas por Hosny *et al.*, 1998 para *Scutellospora gregaria*. Estos datos indican que los hongos micorrizico arbusculares tienen un genoma más grande que otros hongos.

El genoma haploide (Hijri y Sanders., 2004 y 2005) de los hongos micorrízicos, está formado tanto por secuencias de copia única, como por secuencias repetidas (aproximadamente el 1.6% en *Glomus intraradices*) (Hijri y Sanders., 2004). Un naciente número de secuencias génicas obtenidas de esporas individuales de *G. caledonium*, *G. geosporum* y *G. mosseae* (Stukenbrock y Rosendahl., 2005), indican que el grado de duplicación génica en los hongos micorrízicos, debe estar más limitado, involucrando sólo a regiones específicas del genoma. También, se han encontrado en genoma de estos hongos, secuencias con homología a Long Terminal-Repeats (LTRs). Otra característica de dicho genoma fúngico, es el bajo contenido de GC que forman parte del mismo, sólo el 30-35%, y casi el 25% de la cisteína esta metilada (Hosny *et al.*,1997), siendo este porcentaje demasiado alto para tratarse de hongos.

## **2.2. Establecimiento de la Simbiosis**

El proceso de colonización por el HMA comienza por la germinación de las esporas del hongo. A continuación, se forman haustorios por donde penetra la hifa a la superficie radical y coloniza el espacio intercelular del córtex de la raíz. Se activan enzimas degradadoras de pared celular no agresivas en el hongo, y tanto las células de las raíces como las del hongo cambian su patrón de expresión génica y su morfología. La hifa penetra a través de las paredes celulares y dentro de las células del córtex desarrolla estructuras de tipo arbuscular, denominadas arbuscúlos, formadas mediante repetidas ramificaciones dicótomas.

Estos hongos, al establecerse en la zona cortical del sistema radical de las plantas, tienen la característica de formar estructuras internas, las cuales de acuerdo con su función pueden favorecer el intercambio nutrimental y el almacenamiento de reservas. Los arbuscúlos son estructuras fúngicas como los haustorios que se generan en el interior de las células corticales y cuyo papel es contribuir al incremento de la capacidad de absorción y aprovechamiento de nutrimentos por ambos participantes de la simbiosis (Bolan., 1991; Sieverding., 1991).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se caracterizan también por presentar un crecimiento intra e intercelular en la corteza de la raíz y por formar dos tipos de estructuras, arbusculos y vesículas (Quilambo., 2003). Los arbusculos son hifas que se dividen dicotómicamente, son invaginados por la membrana plasmática de las células corticales y presentan periodos de vida cortos, mientras que las vesículas son estructuras de almacenamiento que se forman en la parte terminal de las hifas (Barker y Delp., 1998).

Por otra parte a nivel celular, la interface en todos los tipos de HMA está compuesta de las membranas de ambos patrones, separados por una región del apoplasto. El desarrollo intracelular afecta la estructura de la pared del hongo, el metabolismo y la fisiología, incluyendo la represión de la superficie y enzimas extracelulares (Smith y Gianinazzi-Pearson., 1988). La reacción de penetración y proliferación del hongo parece similar en diferentes endomicorrizas en la presencia del haustorio intracelular; pero las células del hospedante muestran modificaciones más específicas. La interface formada entre la célula de la planta y el hongo involucra una nueva formación de la membrana de la planta que se extiende desde la membrana plasmática de la periferia alrededor del haustorio del hongo (Smith *et al.*, 1994).

Entre otros casos los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no producen vesículas, en lugar de ellas forman células auxiliares, las hifas externas pueden ser de tres tipos según su morfología y las funciones que llevan a cabo: Las hifas infectivas, son las que inician los puntos de colonización en una o varias raíces; las hifas absorbentes son las que se encargan de explorar el suelo para la extracción de nutrientes y las hifas fértiles son las que llevan las esporas (Peterson *et al.*, 2004).

En algunos casos, se forman vesículas ricas en lípidos, que son órganos de almacenamiento intercelulares, y finalmente se forman esporas extrarradicales, que pueden comenzar otro proceso de colonización. Los arbusculos, invaginaciones de la membrana donde tiene lugar el intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo, son la estructura clave de la micorriza arbuscular.

Cuando las plantas son invadidas por microorganismos del suelo, se inician una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que no ocurren cuando un HMA coloniza la planta, esto soporta la hipótesis de que el hongo emite señales que reconoce la planta para que ésta no inicie una reacción de defensa. Adicionalmente, la planta también libera compuestos de naturaleza volátil o difundible (exudados) que estimulan el crecimiento de la hifa en diferentes puntos de control mientras se da la colonización fúngica (Gadkar *et al.*, 2001).

Se sabe que algunos procesos del establecimiento de la simbiosis MA están mediados por fitohormonas (Baker y Tagu., 2000) y se cree que las hormonas con un papel más importante en estos procesos son las citoquininas (CKs), el ácido abscísico (ABA) y posiblemente el ácido jasmónico (AJ) (Strack *et al.*, 2003). No obstante, se conoce muy poco acerca de los compuestos señalizadores durante el establecimiento y el mantenimiento de la micorriza arbuscular.

Este tipo de actividad fúngica representa un costo para la planta, la cual tiene que compensar mediante la aportación de fotosintatos carbonados, para que se facilite la actividad metabólica del hongo. Se ha hecho la estimación de que aproximadamente entre 10 y 30 % de los fotosintatos producidos se requieren para la formación, mantenimiento y funcionalidad de las estructuras micorrízicas, generándose así un sistema de beneficio mutuo (Marschner y Dell., 1994).

Es por eso que los hongos micorrizógenos juegan un papel multifuncional dentro del ecosistema, ya que incrementan la habilidad de las plantas para la absorción de nutrimentos y mejoran su nutrición al esparcirse por el suelo e indirectamente las protege del ataque por patógenos (Requena *et al.*, 2001). Intervienen en las relaciones hídricas de las plantas explorando el suelo y proporcionándoles agua (Faber *et al.*, 1991; Davies *et al.*, 1992).

### 2.3. Importancia de los HMA en el Suelo

Los HMA contribuyen de manera importante en los procesos de formación y estabilización del suelo, lo que mantiene su fertilidad (Requena *et al.*, 2001) ya que participan en la formación de agregados por acción mecánica y química, debido a que la red micelial atrapa y compacta partículas primarias del suelo a través del efecto de la sustancia llamada glomalina (Camargo-Ricalde., 2002).

Esto se debe a que las hifas micorrízicas son el componente mayor de los hongos del suelo donde se desarrollan plantas, en particular cuando son micorrízicas esto es, por que son susceptibles de la colonización por estos hongos (Kabir *et al.*, 1997).

La longitud hifal de las micorrizas en el suelo ayudan a la contribución de la absorción de nutrimentos poco móviles que se encuentran en el suelo en comparación con las raíces de la planta raíz, siendo que el área de la superficie por unidad de volumen de las hifas de HMA puede ser aproximadamente de 100 veces más abundante que las raíces de las planta hospedera (Harley., 1989). Esta cantidad de hifas varía en los ecosistemas y presenta valores promedio comunes de 0.5 a 5 m de hifa por gramo de suelo en suelos cultivados y de hasta 20 m en suelos no perturbados.

En estudios anteriores se observó que la arquitectura del micelio de los HMA varía entre géneros (Dodd *et al.*, 2000). Esta característica puede influir diferencialmente en el papel de los géneros de HMA en la agregación del suelo. Existen características entre cada especie como ocurre en la familia Gigasporaceae que forman redes hifales muy finas y pueden desempeñar un papel importante para atrapar las partículas del suelo (Tisdall., 1991; Miller y Jastrow., 1992), mientras que las especies del género *Glomus*, al formar hifas corredoras más gruesas, pueden facilitar mayor flujo de nutrimentos a la planta estas características pueden ser de gran importancia en la selección de las especies de HMA para la producción de nuestro biofertilizante.

Las hifas de los HMA exudan polisacáridos y otros compuestos orgánicos formando una malla pegajosa que une a las partículas individuales del suelo y microagregados para formar macroagregados (Mehta *et al.*, 1960; Acton *et al.*, 1963; Brady y Weil., 1999).

Los primeros trabajos que se reportaron sobre este tema fueron realizados por Aspiras *et al.*, (1971) y Tisdall y Oades., (1980), quienes mostraron que los polisacáridos que producen las hifas son los que estabilizan a los agregados, en especial si éstas no se rompen y sus partes más internas no se exponen (Allison., 1968, 1973). Como resultado, los polisacáridos pueden permanecer intactos dentro de los agregados y no ser disponibles al ataque microbiano.

Entre las gomas de origen fúngico que participan en la agregación existen el sclerogum y la glomalina, el primero es un polisacárido extracelular producido por un hongo saprobio *Sclerotium* que se adsorbe sobre las superficies de partículas (Chenu., 1989), como la montmorillonita o caolinita y la glomalina la cual es una glicoproteína que las hifas de los HMA exudan, de carácter hidrofóbico y que se acumula sobre las partículas de arcilla. El nombre de la glomalina se derivó de la antigua ubicación de estos hongos dentro del orden de los Glomales (Morton y Benny., 1990).

Además, gracias al uso más eficiente que hacen las plantas micorrizadas de los nutrientes del suelo, permiten ahorrar fertilizantes químicos y reducir por consiguiente los problemas de contaminación que el uso excesivo de fertilizantes conlleva. Por otra parte, las plantas micorrizadas son capaces de hacer un mejor uso de los fertilizantes orgánicos, bien sea debido a la producción de fosfatasa por parte de los hongos mismos (Dodd *et al.*, 1987; Joner y Johansen., 2000) o bien gracias a la asociación existente entre las hifas de las MA y los microorganismos que participan en la mineralización de la materia orgánica (Azcón-Aguilar y Barea., 1992).

La red hifal de algunos HMA que se forman en el suelo y que conecta especies de diferentes genero y familia (Kottke *et al.*, 2007), es un sistema de transferencia de carbohidratos y de nitrógeno entre plantas de diferentes especie. Simard *et al.*, (1997) usando isótopos de carbono duales, para medir la transferencia entre abedules (*Betula*

*papyrifera*) y abetos Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) y así obtener el flujo neto del carbono, encontraron que plántulas de abeto reciben hasta el 10% del carbono fijado por el abedul, en un periodo de 9 días.

Los HMA están involucrados en la captación de nitrógeno (N) y fósforo (P), las investigaciones sobre los HMA ha destacado el papel de la simbiosis en la facilitación de la captura de estos nutrientes en forma iónica, la atención se ha desplazado desde mediados del decenio de 1980 para analizar las capacidades de los HMA para liberar N y P de los materiales detríticos de la fauna microbiana y los orígenes de la planta, que son los principales fuentes de estos elementos en los ecosistemas terrestres.

Los HMA producen micelio fuera y dentro de la raíz, vesículas, esporas y arbuscúlos, y con excepción de estos últimos, todas ellas pueden usarse para iniciar la colonización de una nueva planta hospedera. No obstante, las esporas son propágulos particularmente importantes, ya que son las únicas estructuras que se utilizan para determinar a las especies y se sabe que algunas especies solo pueden colonizar nuevos hospederos a partir de micelio producido por la germinación de la espora (Gazey *et al.*, 1993).

Por otra parte los géneros *Scutellospora* y *Entrophospora*, son altamente diversos en los trópicos (Sieverding., 1991), sin embargo, si los agroecosistema son alterados constantemente, géneros como *Scutellospora* y *Gigaspora* son menos frecuentes que en suelos no alterados (Siqueira *et al.*, 1989). *Glomus intraradices* es una especie considerada nitrofílica y es encontrada con mayor frecuencia en plantas leguminosas con alto contenido de nitrógeno (Santos *et al.*, 2007). Los fosfatos de hierro y aluminio que tienden a formarse con mayor frecuencia en suelos extremadamente ácidos, también están afectando la esporulación de los HMA (Peña *et al.*, 2007).

## 2.4. Los HMA en la Agricultura

Se utilizan dos métodos importantes para manejar los HMA en la agricultura, uno de ellos es con hongos nativos con el fin de obtener el mejor beneficio de ellos, estimulando uno o varios de los géneros después de que han sido determinados, y el otro es introducir o inocular con HMA seleccionados que puedan ser manejados con prácticas agronómicas que ya hayan sido utilizadas con estos hongos (Sieverding, 1986., Klironomos., 2003). El problema de este último método es que la inoculación puede alterar la acción de los HMA nativos eficientes, al competir con los hongos seleccionados (Sieverding., 1986). Sin embargo, es una opción importante ya que los sistemas de monocultivo reducen la abundancia de las especies fúngicas (Sieverding., 1991., Oehl *et al.*, 2003, Allen y Boosalis., 1983), debido a que limitan los beneficios que le proporcionan los HMA a la planta, al seleccionarlos (Sieverding., 1991).

Por tanto el pH, la humedad del suelo y la disponibilidad de nutrientes están influyendo tanto en la colonización micorrízica como en el número de esporas, en diferentes cultivos y variedades de una misma especie vegetal se han obtenido diferentes respuestas de crecimiento de la planta, de acuerdo a la especie de HMA utilizado para inocular (Khanam *et al.*, 2006).

En la agricultura, el uso de HMA tiene un gran potencial biotecnológico debido a que facilitan la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Por lo tanto, plantas micorrizadas poseen una ventaja importante con respecto a las plantas no micorrizadas (Da Silva y Cardoso., 2007). Sin embargo, el conocimiento sobre las interacciones entre las condiciones edáficas y la ecología de los HMA nativos y la efectiva asociación simbiótica entre las plantas y estos microorganismos es limitado. Por esta razón, el análisis de poblaciones de HMA nativos y su ambiente edáfico, pueden conducir a su uso eficiente en la agricultura, especialmente de países en vías de desarrollo (Serralde y Ramírez., 2004).

Por otra parte, la colonización de las raíces por HMA ocurre no sólo con esporas que germinan, sino también por raíces colonizadas y por micelio que se encuentre previamente en el suelo. En los suelos del trópico la densidad de esporas es baja, por lo que el micelio de hongos micorrizógenos arbusculares es la principal fuente de inoculó (Fischer *et al.*, 1994).

Es inexacto evaluar la comunidad de los HMA basados únicamente en la densidad de esporas en el suelo, el porcentaje de raíces colonizadas o la densidad de hifas en el suelo por separado, ya que se subestima el efecto real de los propágulos y por lo tanto, el valor de potencial de inóculo del suelo, por ello, además de la contabilización de esporas como un indicativo de la efectividad de un suelo es necesario determinar el número de propágulos (esporas, esporocarpos, hifas extrarradicales, fragmentos de raíces colonizadas) (Allen *et al.*, 1998).

Adicionalmente, en algunas evaluaciones se ha establecido el efecto benéfico de la asociación MA sobre la productividad del maíz en condiciones controladas; por esto, el uso adecuado de HMA como biofertilizante es una herramienta biotecnológica que puede mejorar la producción a través del establecimiento de sistemas de producción sostenibles y competitivos (Roveda *et al.*, 1998; Urdaneta y Roveda., 1999). Actualmente en Tabasco no se emplean las micorrizas de manera dirigida para mejorar el redimiendo de grano, por lo cual existe un potencial a ser determinado mediante estudios sobre las especies encontradas en cada municipio de la sabana por eso este estudio está dirigido a la identificación, selección de especies de HMA y evaluación de las especies de HMA que durante mucho tiempo han estado en simbiosis con el cultivo de maíz en la sabana, por lo cual emplearemos estas especies para la fabricación de un biofertilizante que ayude a obtener mejores rendimientos con bajos insumos para el productor.

También es importante mencionar que el HMA permite a la planta usar de manera más eficiente los nutrientes del suelo, razón por la cual se pueden reducir los problemas de contaminación del este por el exceso de fertilizantes químicos, si hay una reducción en la aplicación de los mismos (Barrera., 2009).

Aunque algunas de las limitantes para la colonización de las esporas puede ser que se encuentren concentraciones altas de P en el suelo causando la disminución o inhibición de la colonización micorrízica, pero cuando el nivel de este elemento es demasiado alto y hay ya una colonización micorrízica en la planta también se dice que la planta se vuelve dependiente de los HMA (Kahiluoto., 2000). El nivel de pH también afecta el número de esporas en el suelo debido a que un ligero aumento del pH cambia el nivel de saturación de aluminio, causando una disminución en este parámetro, por lo que en arcillas por ejemplo, mejora la capacidad de intercambio catiónico del suelo favoreciendo la densidad poblacional de microorganismos, en nuestro caso la esporulación de HMA (Peña, *et al.*, 2007).

## **2.5. Uso de Inoculantes Micorriza–Maíz**

En un ensayo previo realizado por Ferraris *et al.*, (2002) sobre evaluación de la inoculación con micorrizas en maíz bajo diferentes ambientes de fertilidad que fue implantado en siembra directa, utilizando maíz híbrido H 2750 MG, el ensayo se condujo con un diseño en bloques completos aleatorizados, con tres repeticiones y seis tratamientos en arreglo factorial (testigo, testigo PS, testigo PSN, micorrizas, micorrizas PS, micorrizas PSN). Concluyeron que la inoculación con micorrizas y el agregado de fertilizantes químicos lograron incrementar significativamente los rendimientos del cultivo de maíz. Dicho incremento alcanzó en promedio al 9% en el caso de la inoculación, y un rango del 13 al 21% por el agregado de fertilizantes. En el caso de la inoculación, los incrementos de rendimiento fueron independientes de la estrategia de fertilización empleada, manteniéndose relativamente estables en un amplio rango de dosis.

Uribe y Dzib., (2006), compararon la aplicación de micorrizas (*Glomus intraradices*), *Azospirillum brasilense* y la fitohormona brassinoesteroide en el cultivo de maíz con la aplicación de fertilizantes químicos convencionales. En conclusión, en los cuatro años de evaluación no se registraron diferencias estadísticas significativas en rendimiento ( $p \geq 0.811$ ) entre los tratamientos, pero se observó que los tratamientos

con microorganismos benéficos de micorriza y *Azospirillum* superaron al testigo absoluto con un rendimiento  $3.07 \text{ t ha}^{-1}$  y con un incremento del 0.65%.

En condiciones de estrés, las plantas presentan cambios en crecimiento y morfología que se relacionan con alteraciones en el metabolismo y en la composición bioquímica de las plantas. Plantas en asociación con microorganismos del suelo (micorrizas arbusculares) han desarrollado estrategias de adaptación, las cuales han sido el resultado de complejos procesos evolutivos (Sanders *et al.*, 1996). Resultados experimentales muestran cómo plantas de maíz micorrizadas, acumulan azúcares al ser sometidas a temperaturas bajas, sequía y niveles bajos de radiación, esta condición mejora la capacidad para soportar estrés (Boucher *et al.*, 1999).

Investigaciones realizadas en plantas de maíz demuestran que niveles deficientes de fósforo inorgánico en el suelo causan disminución en el área foliar, como consecuencia de una reducción en la oferta de carbohidratos, dado que la mayoría de estos compuestos son requeridos por la raíz. Este mecanismo de compensación ocurre pocos días después de la deficiencia de fósforo (Atkinson., 1973; Fredeen *et al.*, 1989; Rao y Ferry., 1989; Pellerin y Mollier., 2001). Por otro lado, mayores niveles de fósforo disponible en el suelo incrementan el peso seco de la planta y promueven el crecimiento radical debido a las mayores tasas en el crecimiento de raíces centrales y laterales. Esta proliferación de raíces está relacionada con una mayor elongación y producción de pelos radicales (Peck *et al.*, 1988; Russo y Pappelis., 1995).

Roveda y Polo., (2007) realizaron un trabajo de investigación en donde evaluaron los mecanismos de adaptación de maíz asociado con *Glomus* spp., en suelos con bajo fósforo disponible, El diseño experimental utilizado fue bloques completos al azar, con seis tratamientos y seis repeticiones: tres tratamientos con 1, 40 y  $100 \text{ mg Kg}^{-1}$  de P en el suelo y los anteriores niveles de P más *Glomus* spp. En conclusión se observó que las plantas de maíz asociadas a micorrizas arbusculares del género *Glomus*, presentaron mayores índices de crecimiento, expresados en biomasa (materia seca y área foliar) como consecuencia de una mejor nutrición mineral por parte del hospedero, especialmente relacionada con el fósforo, que indujo a un

estímulo en el crecimiento vegetal. Estos resultados permiten suponer que la asociación simbiótica con *Glomus* spp. contribuye con la síntesis de proteínas de estrés, las cuales forman parte de la respuesta al déficit de fósforo en el suelo, estas proteínas específicas de estrés, llamadas "micorrizas", posiblemente dotan a las plantas con la capacidad de adaptarse al estrés medioambiental por medio de ajustes fisiológicos y bioquímicos, las micorrizas pueden ser inducidas por la asociación MA, en respuesta a la infección con el hongo, pero su función específica aún se desconoce Boucher *et al.*, (1999).

Uribe *et al.*, (2007) mencionaron que con el uso de biofertilizantes es posible disminuir el uso de fertilizantes químicos, ya que el comportamiento de los biofertilizantes en la producción de maíz en condiciones de temporal en el sistema roza, tumba y quema, se encontró que durante cinco años continuos se observaron cuatro variables de respuesta: altura de planta, días a flor masculina, área foliar y rendimiento de grano. Encontrando como resultado que la altura de la planta presentó un comportamiento similar entre los tratamientos biofertilizante, fertilización química y el testigo absoluto cuando fue aplicada la dosis 13-33-00, y en relación con la variable de respuesta el rendimiento en el tratamiento *Azospirillum*, *Azospirillum* + Micorriza y *Azospirillum* + Micorriza + Brassinoesteroide; estos fueron los tratamientos con más rendimientos superando el tratamiento químico en un 4.8, 5.3 y 6.5%.

Para las condiciones agroecológicas de la sabana de Tabasco se consideró importante evaluar el potencial de estas relaciones micorrízicas para determinar el beneficio de las diferentes especies que existen en nuestra sabana y que han colaborado en la adaptación de estos cultivos a diferentes condiciones climáticas y edáficas, por lo cual se plantea este trabajo para identificar estas especies y usarlas como apoyo en el cultivo de maíz, para mejorar la absorción de nutrientes de baja movilidad para tener menores insumos y mayor rendimiento de grano en estos suelos ácidos.

## 2.6. Número más Probable de Propágulos

Las metodologías empleadas para evaluar la presencia de los HMA en el suelo muestran un alto nivel de incertidumbre al estimar únicamente las estructuras fúngicas (esporas, raíces colonizadas o micelio) por separado. Para evaluar el número total de propágulos de HMA capaces de provocar la colonización de raíces de plantas hospederas. Porter (1979) ha sugerido un cálculo del número más probable (NMP) de propágulos infectivos como una aproximación más certera acerca del potencial de inóculo de un suelo o sustrato.

En estudios agroecológicos, es importante determinar el número de propágulos infectivos en el suelo, esta información nos permite saber la capacidad de los HMA para desarrollar simbiosis con la planta, y el tiempo que tarda en establecerse la colonización (Janos., 1996).

Los propágulos de HMA generalmente se encuentran concentrados en los primeros centímetros de profundidad del suelo (Bellgard., 1993), pueden sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales, y colonizar la raíz a través de varios tipos de propágulos como son esporas latentes, hifas en fragmentos vivos de raíz, hifas en raíces muertas, y la red de micelio (Schalamuk y Cabello., 2010), sin embargo, se sabe que la infectividad de dichos propágulos y la efectividad micorrízica puede ser afectada por diferentes factores bióticos y abióticos (Brundett., 1991).

Dentro de los factores abióticos que afectan negativamente la asociación micorrízica se encuentran las prácticas intensivas de manejo agrícola (Bethlenfalvay., 1992), consistentes en el uso excesivo de fertilizantes y agroquímicos que inhiben el establecimiento de la simbiosis y la efectividad de los HMA en la planta (Baum y Makeschin., 2000; Kjölller y Rosendahl., 2000). Adicionalmente, la excesiva mecanización agrícola y la ausencia de cobertura vegetal favorecen la erosión del suelo y, en consecuencia, reducen el número de propágulos, la biodiversidad y la funcionalidad de dichos simbioses (Barea y Jeffries., 1995).

Es importante tener en cuenta los diferentes tipos de propágulos de los HMA para evaluar el potencial del suelo inoculado ya que si se considera un solo tipo puede dar resultados poco fiables; las esporas, por ejemplo, se producen en algunas especies como resultado del estrés al medio ambiente, (McGee *et al.*, 1997, Allen *et al.*, 1998), como consecuencia, gran cantidad de estas esporas no se correlaciona con la colonización de raíz (Douds y Miller., 1999). Además, una alta colonización de la raíz no implica una mayor efectividad, para evaluar el potencial del inóculo en el suelo de una vegetación secundaria con diferentes grados de desarrollo se ha empezado analizar la cantidad de propágulos de los HMA como son (raíz colonizada, longitud del micelio, esporas vivas, y la infectividad de los propágulos) y sus densidades en parcelas de diferentes edades (Clapperton y Reid., 1992).

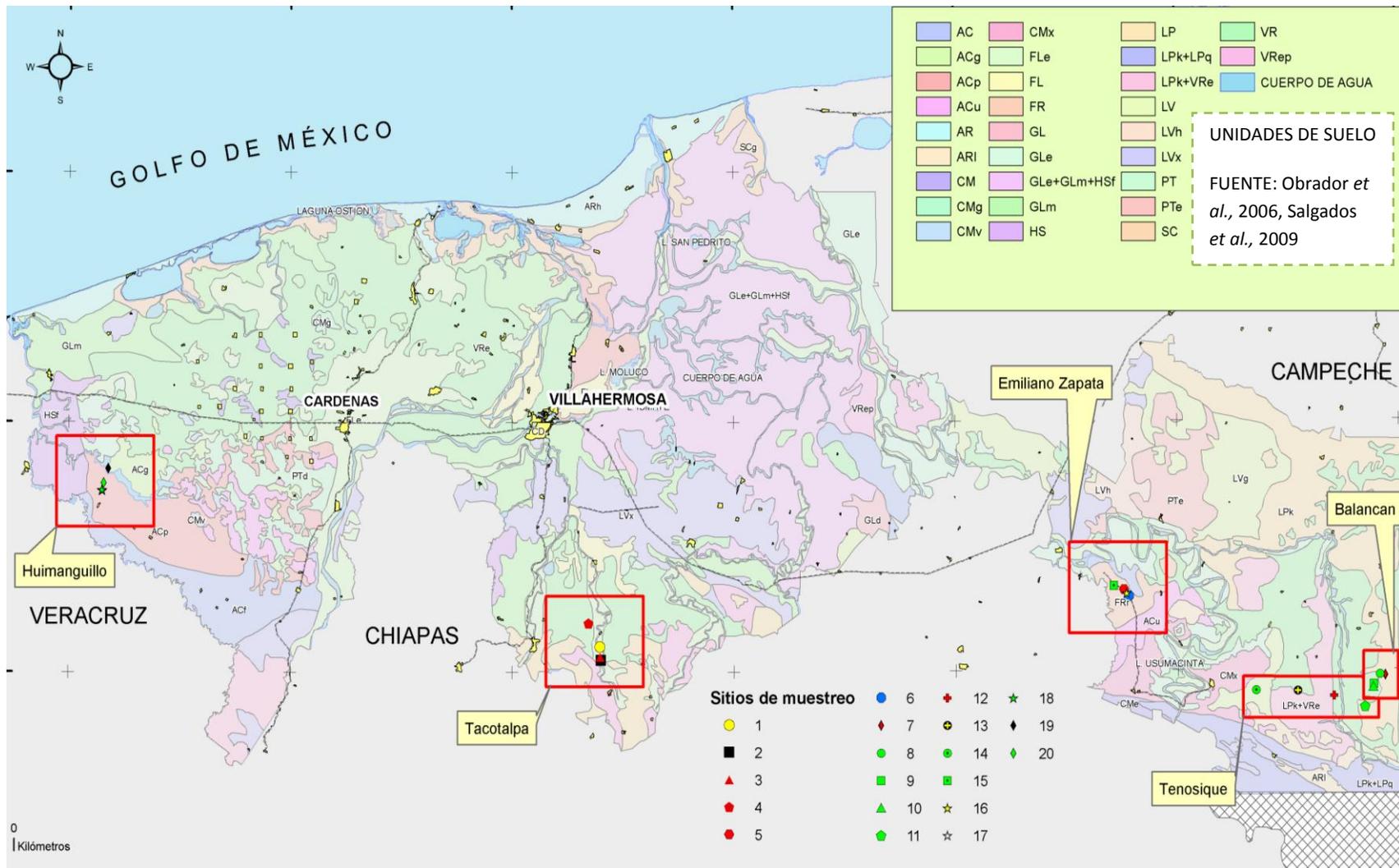
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Número más Probable de Propágulos

En este ensayo se evaluaron esporas obtenidas de cinco municipios de la zona de sabana de Tabasco (EZ: Emiliano zapata, TE: Tenosique, HU: Huimanguillo, BA: Balancan y TA: Tacotalpa) véase (Figura 1) de un estudio previo realizado para la “Caracterización de HMVA Asociados al Cultivo de Maíz en Tabasco” (Osorio *et al.*, 2008). Las variables que se evaluaron con este estudio fueron estimación del número de propágulos y el número de esporas, con estas variable se seleccionaron tres de los cinco municipios para la producción de nuestro inoculó.

En la realización de este ensayo se conoció la capacidad infectiva de cada una de las muestras ya que al evaluar la comunidad de los HMA basados únicamente en la densidad de esporas, porcentaje de raíces colonizadas o la densidad de hifas en el suelo, resulta impreciso ya que se subestima el efecto real del conjunto de propágulos, y por lo tanto, el potencial inoculante del suelo; por ello, además de contabilizar las esporas como un indicativo de la capacidad inoculadora de un suelo, es necesario estimar el número de otros propágulos como esporas, esporocarpios, hifas extrarradicales y fragmentos de raíces colonizadas (Allen *et al.*, 1998).

La preparación del sustrato para la evaluación del número de propágulos infectivos de HMA, se realizó usando como sustrato una mezcla 8:1 (v:v) de vermiculita y peat moss para evaluar el número total de propágulos de HMA capaces de provocar la colonización de raíces de plantas hospederas esta prueba se realizo para cada uno de los municipios (Porter,1979), (Cuadro 2).



**Figura 1.** Localización geográfica de los sitios de muestreo de HMA en las cinco sabanas de Tabasco, 2008.

**Cuadro 2.** Preparación de diluciones para evaluar el número más probable (NMP) de propágulos infectivos de hongos micorrizógenos arbusculares.

<b>Dilución</b>	<b>Preparación del sustrato</b>
Sin diluir	200 g de suelo esterilizado, una capa de 50 g del suelo a evaluar, una capa final de suelo esterilizado.
$4^{-1}$	75 g de suelo a evaluar y se mezcla con 225 g de suelo estéril y se toman 50 g para cada maceta.
$4^{-2}$	De la mezcla $4^{-1}$ se toman 75 g y se mezcla con 225 g de suelo estéril, y se toman 50 g para cada maceta.
$4^{-3}$	De la mezcla $4^{-2}$ se toman 75 g y se mezcla con 225 g de suelo estéril, y se toman 50 g para cada maceta.
$4^{-4}$	De la mezcla $4^{-3}$ se toman 75 g y se mezcla con 225 g de suelo estéril, y se toman 50 g para cada maceta.
$4^{-5}$	De la mezcla $4^{-4}$ se toman 75 g y se mezcla con 225 g de suelo estéril, y se toman 50 g para cada maceta.
$4^{-6}$	De la mezcla $4^{-5}$ se toman 75 g y se mezcla con 225 g de suelo estéril, y se toman 50 g para cada maceta.

De acuerdo con la técnica de Porter (1979).

## Procedimiento

1. Se colocaron en cada una de las macetas 200 g de suelo estéril.
2. Se le agregaron 50 g del suelo de cada una de las mezclas realizadas.
3. Se agregó 50 g de suelo estéril, para cubrir el suelo a evaluar.
4. Posteriormente se colocaron tres semillas de maíz la cual sirvió como planta hospedera a la cual se le aplicó un riego continuo.
5. Se cosecharon las plántulas cinco semanas después.
6. Se procedió a separar las raíces y teñirlas por el método de Phillips y Hayman (1970), es importante tomar las muestras de raíces distribuidas principalmente en los 50 g de suelo que se evalúa.
7. Se realizaron las preparaciones semipermanentes para las observaciones al microscopio óptico, anotando el número de macetas por dilución en que se presentaron las raíces colonizadas.

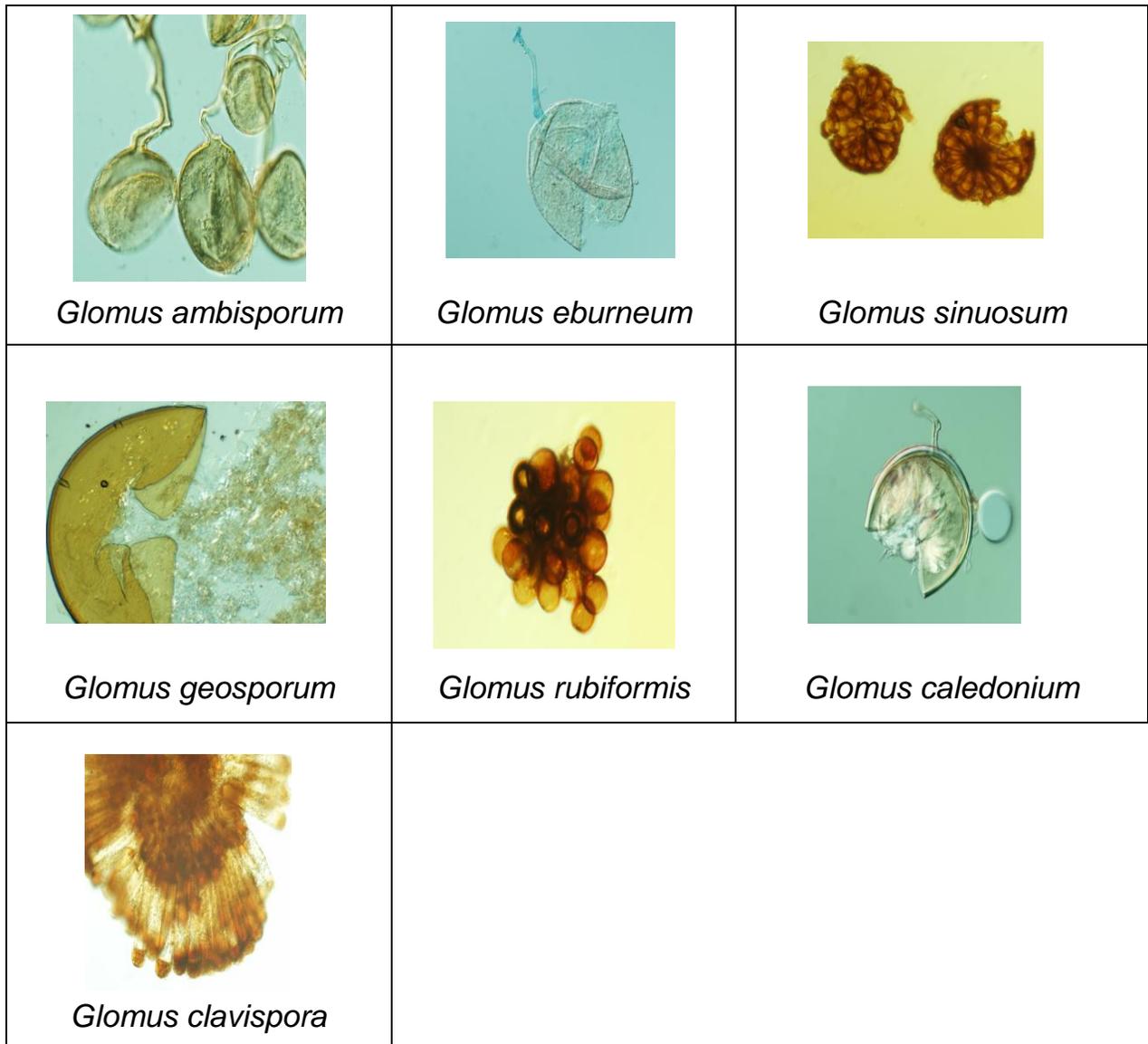
### 3.2. Producción del Inóculo

La segunda fase se realizó en noviembre de 2009, para la producción del inóculo se utilizaron esporas de tres de los municipios seleccionados en el ensayo del número más probable de propágulos (C1: Huimanguillo, C2: E. Zapata y C3: Tenosique), el diseño experimental fue bloques al azar 2 x 3 (tres sustratos: Fluvisol, Acrisol y Cachaza Compostada y en dos condiciones de esterilidad: estéril y no estéril) con tres tratamientos C1, C2 y C3; se utilizaron contenedores de plástico de 5 L de capacidad manteniéndolos al aire libre;. La esterilización del sustrato se realizó por fumigación con  $\text{CH}_3\text{Br}$  ( $1\text{lb m}^{-3}$ ) durante 24 h y aireación por 14 días.

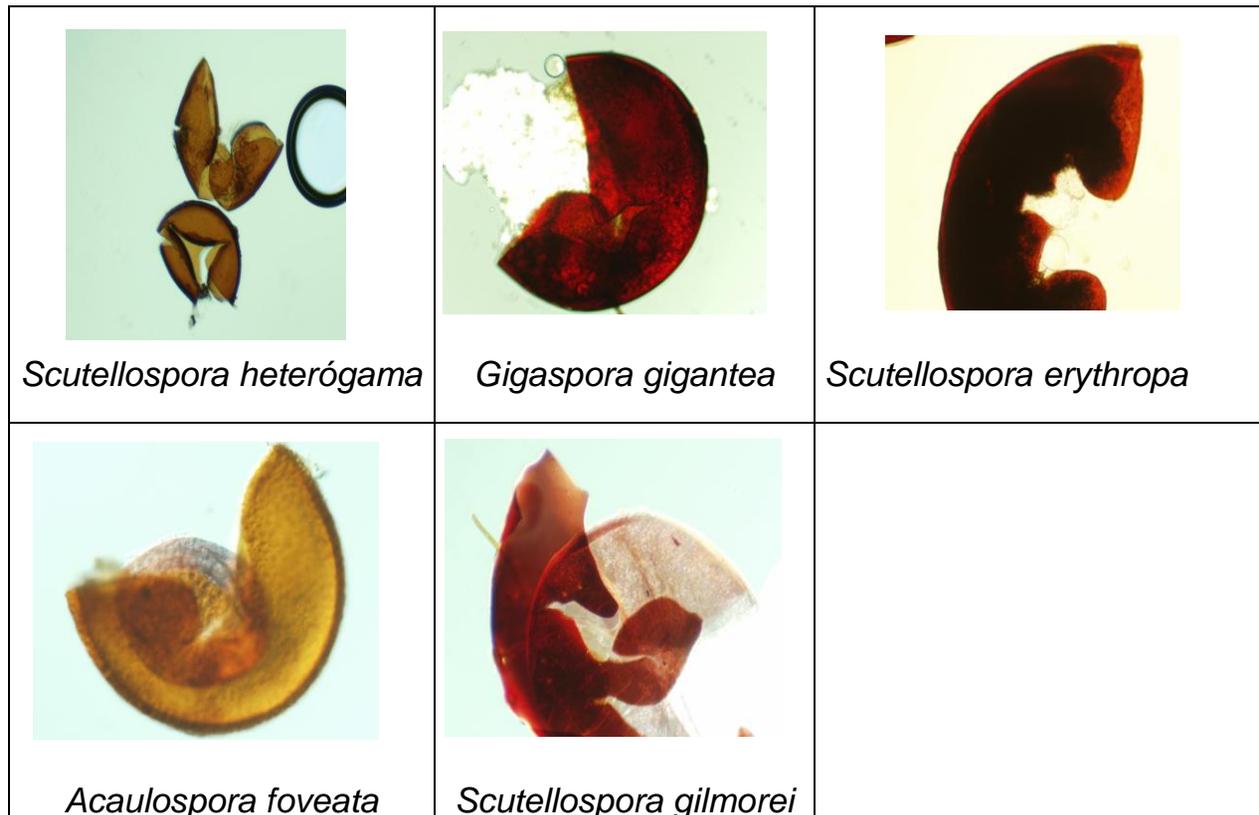
Los contenedores se llenaron con los sustratos de acuerdo al diseño; y se sembraron 3 semillas de maíz criollo (mejen) por contenedor.

Los inoculantes (C1, C2 y C3) contenían las siguientes consorcios de especies de HMA (Figura 2 y 3) C1: *Glomus sinuosum*, *Glomus ambisporum*, *Glomus eburneum*, *Gigaspora gigantea*, *Scutellospora heterógama*, *Scutellospora erythroga*, *Scutellospora gilmorei*, *Acaulospora foveata*; C2: *Glomus sinuosum*, *Glomus ambisporum*, *Glomus rubiformis*, *Glomus caledonium*, *Glomus geosporum* y *Gigaspora gigantea*; C3: *Glomus sinuosum*, *Glomus ambisporum*, *Glomus clavispora* y *Gigaspora gigantea*.

**Figura 2.** Especies de HMA identificadas en suelos de las sabanas de Tabasco, que conforman los consorcios evaluados en campo sobre maíz VS-536.



**Figura 2.** Continuación



Se inocularon los contenedores con los C1, C2 y C3 obtenidos en el ensayo del número más probable de propágulos se aplicaron en suspensión líquida 160 esporas de HMA de cada uno de los tratamientos, la inoculación se realizó a los 7 días después de la germinación del maíz.

Los tratamientos se distribuyeron en un arreglo de bloques completamente al azar con 20 repeticiones, con un total 120 unidades experimentales. La UE consistió de un contenedor plástico con tres plantas de maíz. Las UE eran regadas diariamente buscando mantener la humedad a capacidad de campo (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Pruebas para la producción de inoculantes micorrícicos empleando diferentes sustratos para reproducir consorcios de HMA.

Tratamientos	Sustrato		Contenedores
<b>C1</b>	FLUVISOL	NO ESTERIL	1-20
<b>C2</b>	ACRISOL		21-40
<b>C3</b>	CACHAZA		41-60
<b>C1</b>	CACHAZA	ESTERIL	61-80
<b>C2</b>	FLUVISOL		81-100
<b>C3</b>	ACRISOL		101-120

C1: Huimanguillo, C2: E. Zapata, C3: Tenosique

Tres meses después:

- Las plantas de maíz se colectaron en estado de floración porque en esta fase aún están las esporas y propágulos viables para su análisis.
- Las raíces se procesaron para determinar el porcentaje de colonización de HMA, estas raíces fueron tomadas a los 20-25 cm de la planta para tener un mejor alcance de raíces infectadas por las micorrizas.
- Los sustratos de los contenedores se recuperaron en bolsas estériles, marcadas con el número correspondiente a la muestra y fecha de cosecha.
- Las muestras de raíces y suelo fueron conservadas a -20°C hasta el momento de analizarlas.
- El efecto de los tratamientos se evaluó mediante las variables: número de esporas por 100 g de suelo y porcentaje de raíces colonizadas, con estas variables se seleccionara el sustrato con mejores resultados para cada uno de los tratamientos y el cual tomaremos como nuestro biofertilizante.

### 3.3. Prueba Piloto en Campo

En campo se estableció un experimento en la sabana de Huimanguillo, para evaluar el efecto de tres inoculantes experimentales sobre el rendimiento de grano de maíz, el número de esporas en cada inoculante. La parcela se encuentra entre los paralelos 17° 50' LN y 93° 23' LO, a una altitud de 20 m, y cuenta con un clima cálido húmedo con lluvias todo el año, con una superficie del 0.74% con suelos Acrisoles plinticos que son los más intemperizados por sus problemas químicos adversos, de acuerdo con el pH del suelo se clasifica como fuertemente ácido de 4.5 a 4.8, el contenido de P es muy pobre, los contenidos de Ca + Mg son muy bajos y además el porcentaje de saturación de Al es alto en todo el perfil.

Para la realización de la prueba piloto contamos con la colaboración de un productor cooperante con 4 ha de maíz las cuales ha cultivado con maíz año tras año en esta zona; esta parcela cuenta con un suelo de clasificación textural migajón arcilloso arenoso, migajón arcilloso, migajón arcillo-arenoso, migajón arenoso. Su potencial agrícola consiste en mecanizado continuo y no es apto para la agricultura (Palma-López y Triano, 2002).

La distribución de los tratamientos fue aleatoriamente con tres repeticiones (B1, B2, B3) y seis tratamientos (C1, C2, C3, PC, FQ, TA) donde los consorcios C1, C2 y C3 fueron los inoculos a probar y PC producto comercial (AZOFER), FQ fertilización química N-P-K y un testigo absoluto en el cual no se aplicó ninguna fertilización (Cuadro 4 y Cuadro 5).

El tamaño de cada unidad experimental fue de 10X10 m, obteniendo una parcela útil de 64 m<sup>2</sup> cada una estaba compuesta por 600 plantas; la siembra se realizó en la tercera semana de junio de 2010, se utilizó para la siembra maíz criollo utilizado en la zona (mejen), posteriormente se realizaron visitas cada semana para llevar un control en la germinación del maíz.

**Cuadro 4.** Distribución de los tratamientos para evaluar el efecto de inoculantes micorrícicos sobre maíz VS-536 en un suelo de sabana en Huimanguillo, Tabasco.

<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>
C2	PC	C3
FQ	C2	C1
C1	TA	FQ
PC	C3	TA
C3	C1	PC
TA	FQ	C2

B= Bloque; C1, C2, C3 = Inoculantes experimentales; PC= Inoculante comercial; FQ= Fertilizante químico; TA= Testigo absoluto

A los ocho días de germinado el maíz se realizó una resiembra para evitar fallas por motivo de aves o granos de maíz en senescencia o dañados, una vez realizada la resiembra en la tercera semana se inocularon y fertilizaron cada una de las parcelas dependiendo de tratamiento que les correspondió; la inoculación se realizó aplicando las dosis de suelo con las esporas, agregando en un recipiente las dosis antes mencionadas en un recipiente de 3 L en el cual se le aplico agua corriente se homogenizo completamente y se agrego a cada planta 1 mL aplicando 3 esporas por planta, la inoculación se realizo manualmente, la fertilización química se realizo al voleo manualmente aplicando la siguiente dosis N-P-K (120-60-60).

**Cuadro 5.** Dosis de inoculantes y fertilizante químico sobre maíz VS-536 para evaluar la respuesta de 3 consorcios de HMA en un suelo de sabana en Tabasco.

<b>Inoculantes</b>	<b>Dosis /parcela</b>
<b>C1</b>	599 g
<b>C2</b>	531 g
<b>C3</b>	533 g
<b>PC</b>	60 g
<b>FQ</b>	120-60-60 (N-P-K)

Las variables que se evaluaron para ver la eficacia de cada tratamiento en campo fue el rendimiento del grano en seco y el número de esporas de HMA en 100 g de suelo. La cosecha se realizó la primera semana de octubre de 2010, se cosecharon cada una de las microparcels por separado obteniendo una unidad experimental de 18 muestras solo se obtenía la mazorca de cada planta para obtener el rendimiento de grano.

Para calcular el número de esporas en 100 g de suelo se tomaron tres plantas al azar de cada microparcels aquí la unidad experimental fue de 54 muestras de suelo, se tomó una muestra de suelo de aproximadamente 500 g con una pala recta previamente desinfectada, lavándola con agua destilada entre cada muestra para quitarle el suelo adherido a ella y desinfectándola con etanol al 96%; para evitar la contaminación entre cada muestra. Las muestras se tomaron a un diámetro de 50 cm del tallo, a una profundidad de 0 a 45 cm extrayendo toda la planta y tomando la mayor parte del suelo adherido a las raíces de la planta, ya que es ahí en donde se encuentra la mayor cantidad de esporas de HMA asociadas a la planta.

Los 500 g de suelo obtenido de alrededor de las raíces de la planta de maíz se colocaron en bolsas de polietileno marcando cada una de las muestras con las siglas del tratamiento del cual se obtuvieron, fecha y el número correspondiente a la muestra, éstas se transportaron a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  hasta el laboratorio de Fisiología Vegetal del Campus Tabasco.

### **3.4. Extracción y Purificación de ADN de Esporas**

Las esporas se extrajeron de los tratamientos evaluados en campo (C1, C2, C3, TA, PC y FQ) a partir de 100 g de suelo, la extracción de las esporas se realizó por el método de (Brundrett *et al.*, 1996).

#### Desinfección de esporas

Se prepararon 50 mL de cloramina T al 2% (1g de cloramina T se disolvió en 50 mL de agua destilada estéril y se conservó en frío; este reactivo sólo debe prepararse para su uso inmediato).

Una vez agrupadas las esporas por morfoespecie y tamaño se colocaron en tubos eppendorf de 1.5  $\mu\text{L}$  y se les adicionó 1 mL de cloramina T y se sonificaron por 30 seg, posteriormente en la campana se decantó la cloramina T, se enjuagó de nuevo con cloramina T y se dejó reposar por 20 min en frío.

Posteriormente a los 20 min se decantó la cloramina T y se enjuagó con agua destilada estéril; esto se repitió por tres veces y agitando la muestra en cada ocasión cada muestra para eliminar por completo residuos de la cloramina T, por último se adicionó 100  $\mu\text{L}$  del antibiótico gentamicina a 200mg/L y 200  $\mu\text{L}$  de estreptomicina a 500mg/L y se guardó a  $8^{\circ}\text{C}$  en frío hasta su utilización.

## Extracción de ADN

Este es un método rápido para extracción de ADN con muestras biológicas escasas, este método utiliza el compuesto químico llamado Chelex 100®, esta es una resina quelante con alta afinidad por iones metálicos polivalentes que suelen degradar al ADN cuando este se desnaturaliza a altas temperaturas. El Chelex está compuesto por copolímeros de divinilbenceno, con iones iminodiacetato apareados, que funcionan como grupos quelante de iones metálicos.

Se tomó una espora desinfectada para la extracción de ADN, posteriormente se colocaron las espora en tubos eppendorf de 0.5 mL y se adicionaron 40 µL de TE 1x10.1 (10 mM Tris HCl 1mM EDTA pH 8.0) y se molieron las esporas por completo, posteriormente se agregó 10 µL de Chelex al 30%, se agitó y se incubó a 95°C por 10 min, una vez incubado se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min y se recupero un volumen de 40 µL y se adiciono en tubos eppendorf de 0.5 mL y fue guardado a - 20°C hasta su utilización, este método se utilizo para cada una de las muestras obtenidas de esporas.

## Análisis de restricción de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron las regiones ITS´1 e ITS´4 empleando los indicadores universales ITS1 para la región (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) los cuales se unen a la región final de la subunidad 18S del RNAr y el iniciador ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) la cual se unió a la región 28S, la región amplificada comprende los espaciadores ITS´1 e ITS´2 y la región 5.8S (ITS 1-5.8S-ITS 4).

Se tomaron en cuenta estas regiones porque los iniciadores ITS1 e ITS4 se localizan en las regiones conservadas 18S y 28S y amplifican la región ITS1-5.8S-ITS2 con tamaños que varían entre cada especie desde 576 a 637pb. ITS (Transcripción Intergénicas).

La PCR se realizó realizando una solución utilizando el kit GoTaq® Flexi DNA Polimerasa de la marca promega se preparo una mezcla de reacción de PCR a base de H<sub>2</sub>O MQ (10.5 µl), buffer (2.5 µl), MgCl<sub>2</sub> 30 mM (2.0 µl), dNTP`s 10 mM (0.5 µl), ITS`1 (2.0 µl), ITS`4 (2.0 µl), Taq (0.5 µl), esta reacción se homogenizó centrifugando a 14000 rpm por 14 seg, posteriormente se extrajeron 20 µL de la reacción anterior se coloco en un tubo eppendorf de 0.5 ml a esta reacción se le adiciono finalmente 5µl del ADN extraído de la espora; y se homogenizó la reacción con el ADN centrifugando a 14000 rpm por 14 seg se colocó la muestra en el termociclador de la marca eppendorf AG modelo 22331 Hamburgo.

Las condiciones en las que se llevo a cabo la PCR fueron las siguientes (2 ciclos de desnaturalización a 94°C/ 2 y 1 min, el alineamiento a 52°C/ 1 min, la extensión a 72°C/ 1 min, se realizaron 30 ciclos a estas condiciones y por último la extensión final se realizó a 72°C por 7 min. las muestras y se resguardaron a -20°C hasta su utilización.

#### Electroforesis en gel de agarosa

Para la preparación del gel de agarosa al 1.2% se utilizaron 0.960 g de agarosa y se disolvieron en 80 ml de buffer SB a 20X (Hidróxido de sodio y Ácido bórico), esto se fundió aplicando calor hasta disolución quedara cristalina sin grumos; ya preparado el gel se decanto en el molde evitando la formación de burbujas y se esperó por al menos 30 min para que la agarosa gelificara a temperatura ambiente antes de usar, se utilizo un grosor del gel de 1.5, se tomo en cuenta que el tamaño del orificio en donde se aplicará la muestra, está determinado por el grosor del gel y por las dimensiones del peine. Una vez gelificado se retiro el peine y se coloco el gel con cuidado en la cámara de electroforesis horizontal Bio-Rad (wide mini-sub® CellGT), y la fuente de poder programable Bio-Rad, modelo 1000/500®.

Aplicación de las muestras y fraccionamiento electroforético.

Se tomaron 12  $\mu\text{L}$  de ADN amplificado y se homogenizo con 3.8  $\mu\text{L}$  de amortiguador o naranja G y se aplicó cada una de las muestras en cada uno de los pocillos del gel en un orden determinado, evitando la contaminación cruzada. Se colocó en el gel 1.5  $\mu\text{L}$  de un marcador de talla molecular de 1000pb, y se corrió a 150v durante 40 ó 50 min.

Se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se tiñó en bromuro de etidio en el que se colocó por 10 seg y se dejó reposar en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada por 40 min, y el gel fue visualizados bajo luz UV y analizados usando el documentador de imágenes Syngene® y el Software GeneSnap®.

Purificación a partir de producto de PCR

La purificación se realizó después de haber observado en el gel fracciones de ADN obtenido de las esporas extraídas de cada uno de los tratamientos y se eliminaron proteínas, sales y demás contaminantes quedando solamente el ADN puro.

1. Se recuperó todo el producto de PCR (50  $\mu\text{L}$ ) en tubos eppendorf de 1.5 $\mu\text{L}$ .
2. Se agregó un tercio de acetato de amonio 7 M y 65  $\mu\text{L}$  de isopropanol, esto se mantuvo a  $-20^\circ\text{C}$  por 1 h.
3. Pasada la hora se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min y posteriormente se decantó.
4. Se enjuagó la pastilla con etanol al 70% aplicando a cada muestra 200  $\mu\text{L}$ , se repitió dos veces y entre cada lavado se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min.
5. Se decantó y secó el etanol ya sea a temperatura ambiente o en el concentrador de ADN, hasta su total evaporación
6. Por último, la pastilla se re-suspendió en 15  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.
7. Las secuencias fueron alineadas conforme al programa de BioEdit de edición de alineación y comparación con datos actuales de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### **3.5. Diseños Experimentales y Análisis Estadísticos**

Para la prueba de reproducción de las cepas de HMA y evaluación de sustratos bajo condiciones semicontroladas se empleó un DCA con seis tratamientos (tres sustratos estériles y tres no estériles) y 20 repeticiones, siendo la unidad experimental un contenedor con 2 a 3 plántulas de maíz VS-536.

Durante la prueba piloto de los inoculantes en campo se utilizó un DBA con seis tratamientos (inoculantes experimentales C1, C2, C3; inoculante comercial (AZOFER); fertilización química y un testigo absoluto), con tres repeticiones. Las variables estudiadas en este caso fueron; esporas en 100 g de suelo seco y rendimiento de grano.

Los datos obtenidos durante las etapas de muestreos, reproducción, colonización y experimentación piloto en campo fueron analizados mediante ANOVAS y pruebas múltiples de medias (Tukey 0.05), con ayuda del programa estadístico SAS V 9.1 PROC GLM, en el laboratorio de cómputo del Campus Tabasco.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Número más Probable de Propágulos

Antes de seleccionar los consorcios para fabricar los inoculantes a escala piloto, se realizó una prueba llamada 'Número más Probable de Propágulos' (NMP) la cual evalúa el micelio, esporas, raíces infectadas, arbusculos y otros fragmentos reproductores (Guadarrama *et al.*, 2008), a fin de determinar la capacidad infectiva de los consorcios bajo prueba para propagar los más viables.

El número de propágulos de HMA encontrado fue de 1148.15 en 75 g de suelo, sin importar la sabana de origen (Cuadro 6). En relación con Guadarrama *et al.*, (2008) en su estudio sobre el NMP encontrado en un bosque seco de Oaxaca donde obtuvieron una media de 85,42 NMP en 100 g de suelo, los valores encontrados en nuestro estudio son muy altos, concluimos que las cepas de nuestro estudio contienen una alta variedad de propágulos que facilitan el establecimiento de la simbiosis con la planta hospedera, en este caso el maíz.

Estadísticamente no encontramos diferencias significativas ya que los consorcios arrojaron un valor calculado similar. Se concluye que el número de propágulos de HMA detectados en este trabajo fue muy alto en cada consorcio bajo prueba, lo que indica que sin importar las disoluciones los fragmentos de HMA son eficientes para reproducirse. McGee *et al.*, (1997) mencionan que la presencia de propágulos infectivos de HMA es importante en la regeneración ya que benefician a las plantas hospederas, y dependiendo del inóculo (esporas, hifas, raíces colonizadas) y su densidad permanecen viables aun después de perturbaciones del suelo.

**Cuadro 6.** Número de esporas /100 g de suelo y Número más Probable de Propágulos, encontrados en los consorcios micorrízicos de suelos de sabana de Tabasco.

<b>Consortio</b>	<b>Esporas</b>	<b>NMP/75gr</b>
<b>EZ</b>	60.0a ± 26.8	1148.154
<b>TE</b>	60.0a ± 52.8	1148.154
<b>HU</b>	57.5a ±65.3	1148.154
<b>TA</b>	57.5a ±36.0	1148.154
<b>BA</b>	52.5a ±74.5	1148.154

C.V 94.08; Pr> F 0.99; HSD 91.72, la cifra indica el promedio de seis disoluciones y están seguidas de su SD, No existe diferencia estadística entre consorcios.

Después de determinar el NMP, en estos mismos consorcios se evaluó el número de esporas/100 g suelo; se realizó la prueba de Tukey, para el número de esporas por sustrato. Se encontró que estadísticamente no hubo diferencias significativas en el número de esporas entre los cinco consorcios, ya que las medias obtenidas fueron 60.0 para EZ, TE y de 57.5 para HU y TA, siendo BA de 52.0 (Cuadro 10). Los municipios con mayor número aparente de esporas son EZ y TE seguidos de HU, TA y BA.

Las disoluciones probadas muestran que estadísticamente no se encontraron diferencias significativas, en base a esta prueba se eligieron como consorcios para fabricar los inoculantes aquellos que presentaron mayor producción de esporas; **HU = C1, EZ = C2 y TE = C3.**

## 4.2. Producción de Inoculantes

Antes de producir el inoculante los consorcios seleccionados en el ensayo del número más probable de propágulos se evaluaron en 3 sustratos estériles y 3 sin esterilizar, para determinar cuál era el más conveniente para la propagación de esporas de HMA. A partir de los resultados obtenidos en esta prueba se seleccionara el sustrato con la mejor respuesta para los tres consorcios en producción de esporas y colonización de raíces de maíz.

Al evaluar el ensayo se encontró que los sustratos con mayor cantidad de esporas fueron el Acrisol estéril (930.8 esporas/100g<sup>-1</sup>) y sin esterilizar (781.5 esporas/100g<sup>-1</sup>), seguido del Fluvisol no esterilizado (250.5 esporas/100g<sup>-1</sup>) y esterilizado (220.5 esporas/100g<sup>-1</sup>), siendo los menos favorables para la formación de esporas la Cachaza estéril (24.8 esporas/100g<sup>-1</sup>) y sin esterilizar (7.5 esporas/100g<sup>-1</sup>) lo cual indica que el Acrisol es el más apto para la propagación de esporas de HMA (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Respuesta de tres sustratos a la propagación de HMA sobre producción de esporas y colonización de raíces de maíz.

Trat	Consortio	Sustrato		Esporas /100 g	% Colonización
C1	HU	Fluvisol	NO ESTERIL	250.5 b	80.0 a
C2	EZ	Acrisol		781.5 a	35.0 bc
C3	TE	Cachaza		7.5 b	77.9 a
C1	TE	Cachaza	ESTERILIZADO	24.8 b	53.8 bac
C2	EZ	Acrisol		930.8 a	15.8 c
C3	HU	Fluvisol		220.5 b	72.1 ba
SUSTRATO SIN ESTERILIZAR			SUSTRATO ESTERIL		
CV (%): 77.8			CV (%): 77.3		
Prob. de F. para:			Prob. de F. para:		
Sustratos (S) 0.01			Sustratos (S) 0.01		
Condición (SE) 0.38 NS			Condición (E) 0.02		
Interacción (S x SE) 0.01			Interacción (S x E) 0.54		
MSD (S) 153.0			MSD (S) 22.3		
MSD (SE) 104.2			MSD (E) 15.22		

Dentro de columnas, literales diferentes indican diferencia estadística altamente significativa.

La respuesta observada puede obedecer a que los HMA están adaptados a suelos de sabana y al emplear estos como sustrato en el ensayo, los HMA encuentran condiciones favorables para su desarrollo aun utilizándolos en las dos condiciones estéril y sin esterilizar esto nos comprueba aún más efectividad de los HMA, como se menciona en el (Apartado 4.1.) no sólo las esporas son capaces de colonizar las raíces si no toda la cantidad de propágulos que en cada consorcio se encuentra.

## **Colonización de raíces por HMA**

Al analizar la colonización de raíces de maíz se encontró que hasta 80% de éstas fueron infectadas por HMA; se considera que la inoculación fue exitosa (Cuadro 7). Durante el análisis estadístico por tratamiento, se encontró que los sustratos con mayor porcentaje de colonización fueron Fluvisol sin esterilizar (80%), seguido de Cachaza sin esterilizar (77.9%) y en tercer lugar Fluvisol esterilizado (72.1%). Los resultados indican que el Fluvisol es el sustrato más favorable para la reproducción de los inoculos de HMA ya que con sustrato estéril ó sin esterilizar el HMA infectó mayor número de raíces. Este resultado es alentador pues muestra que la técnica empleada favorece la colonización de raíces por HMA, misma que es necesaria para que el maíz obtenga beneficio nutrimental. Otros autores han reportado porcentajes de colonización de 64 a 75% en maíz (Montaño *et al.*, 2001).

Por otra parte Smith *et al.* (1998) en su estudio sobre el establecimiento de praderas de HMA obtuvieron un 35.3% de colonización en el suelo estéril y 37.7% sin esterilizar; comparando estos resultados con los obtenidos en nuestro análisis los nuestros se encuentran entre los niveles más altos en colonización con un máximo de 80% y un mínimo en 15%.

La respuesta de las variables del numero de espora y el porcentaje de colonización nos permitieron seleccionar el sustrato Fluvisol para ser utilizado como nuestro biofertilizante ya que fue el que mayor adaptabilidad obtuvo en los C1, C2 y C3 como se puede observar en los resultados antes mencionados, en el análisis de número de esporas fueron aceptables para la producción de esporas de HMA aunque en el porcentaje de colonización este sustrato estuvo entre los niveles más bajos, este sustrato nos asegura una mayor cantidad de esporas.

### **4.3. Evaluación de Inoculantes en Parcelas Experimentales en Campo**

#### **Número de esporas en 100 g de suelo**

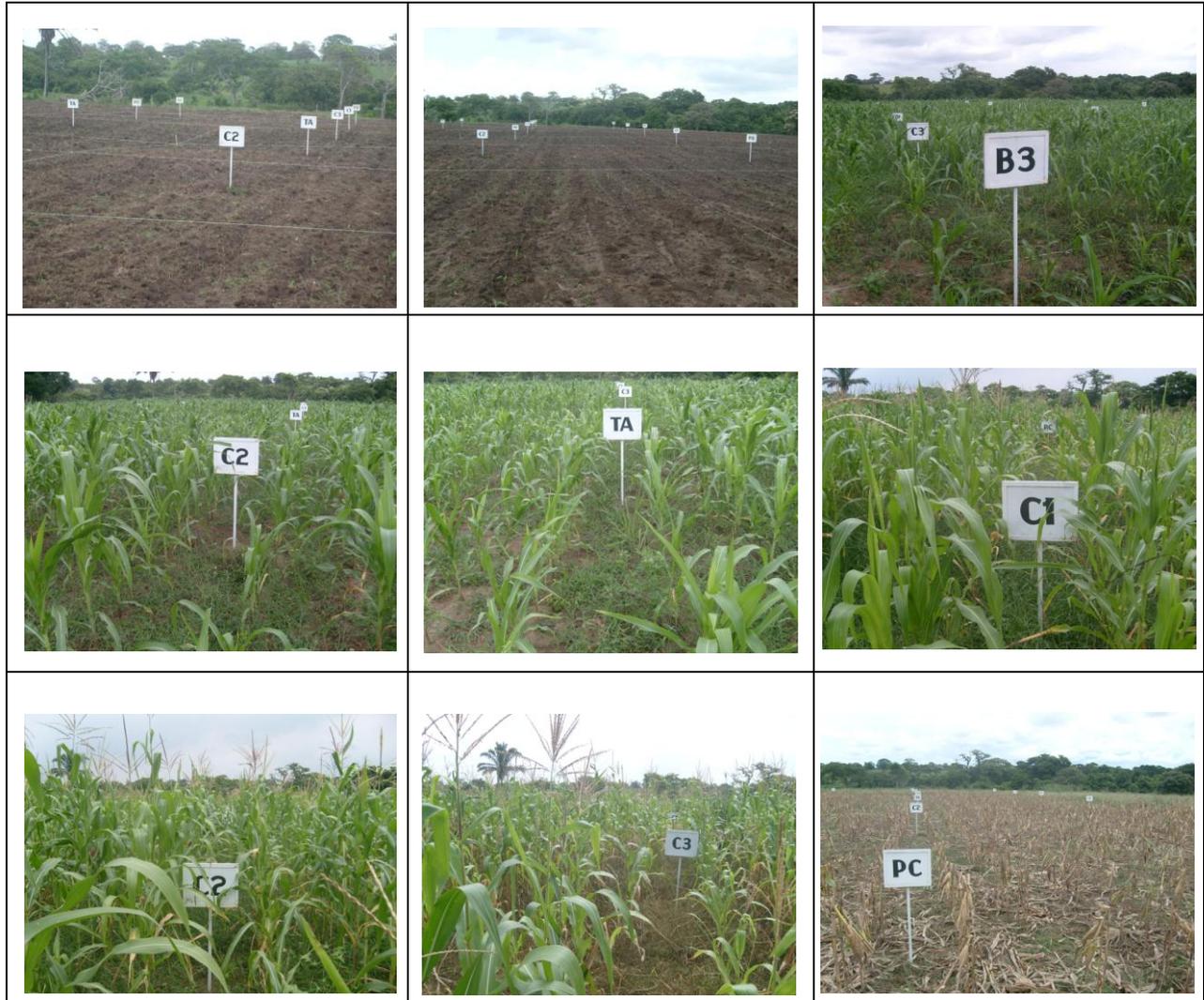
Con los datos obtenidos en cada una de las parcelas experimentales de campo se realizó el análisis de ANOVA para conocer la efectividad y respuestas de nuestros inoculantes utilizados en campo (Figura 3), encontrando que estadísticamente no hay diferencia significativa entre cada uno de los inoculantes evaluados conforme al número de esporas tanto para los tres inoculantes junto con el testigo absoluto, el producto comercial y la fertilización química (Cuadro 8). De acuerdo con los resultados en el que mayor número de esporas se obtuvo fue en la fertilización química con una media de 4600 esporas por 100 g de suelo, seguido del C2 con una media de 4480 esporas por 100 g de suelo y siendo el menor con una media de 3460 esporas en 100 g de suelo el C3 comparando estos resultados con lo obtenidos por Boddington y Dodd (2000), en un estudio realizado para evaluar el efecto de las prácticas agrícolas en el desarrollo de las poblaciones indígenas de hongos micorrízicos arbusculares en diferentes cultivos, en el cual obtuvieron 1600 esporas en cultivos de maíz siendo este dato menor que los obtenidos en este trabajo, lo cual nos demuestra la gran capacidad de nuestras especies de HMA para su reproducción ante las diferentes condiciones del suelo y de nuestro cultivo.

**Cuadro 8.** Número de esporas en 100 g de suelo en parcelas experimentales de maíz VS-536 inoculado con consorcios de HMA en suelos de sabana, en Tabasco.

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>C1</b>	4160 a	± 1623.7
<b>C2</b>	4480 a	± 2823.4
<b>C3</b>	3460 a	± 1267.6
<b>TA</b>	4110 a	± 2132.5
<b>PC</b>	4280 a	± 2029.7
<b>FQ</b>	4600 a	± 1701.6

Pr>F 0.98; CV 50.33; HSD 5968.8, medias con la misma letra no son significativamente diferentes estadísticamente

**Figura 3.** Aspectos de la parcela experimental del Ejido Central Fournier, cultivada con maíz VS-536 inoculado con consorcios de HMA en suelos de sabana, en Tabasco.



## Rendimiento de Grano

Con respecto al rendimiento obtenido en cada uno de los tratamientos evaluados la prueba de Tukey nos indica que si hay una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento con fertilización química con una media de 2097.4 kg ha<sup>1</sup> de grano de maíz con respecto al consorcio 2 con una media de 1147.9 kg ha<sup>1</sup> de grano, con este resultado se puede decir que el mejor tratamiento después de la fertilización química es C2 el cual puede hacer bajar los insumos en el cultivo de maíz, en el tratamiento sin fertilización química ni inoculación los rendimientos fueron más bajos esto nos confirma que la aplicación de nuestros consorcios se deben tomar en cuenta para obtener una mayor productividad (Cuadro 9).

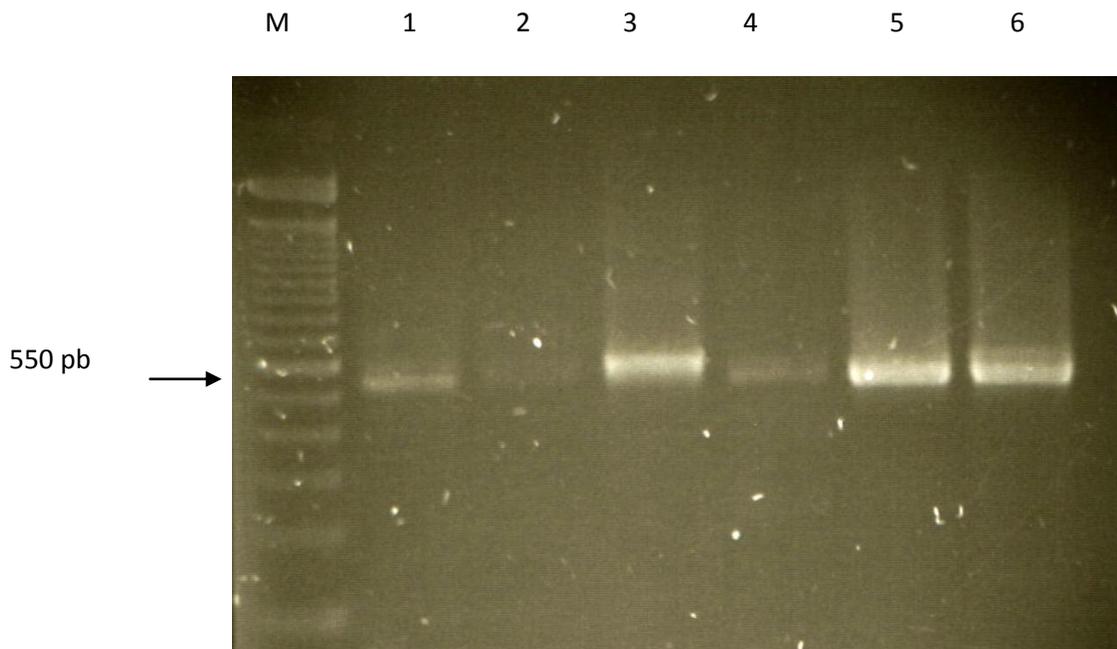
**Cuadro 9.** Rendimiento de parcelas experimentales de maíz VS-536 inoculado con consorcios de HMA en suelos de sabana, en Tabasco (kg ha<sup>-1</sup>).

<b>Tratamiento</b>	<b>Medias</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>C1</b>	736.5 b	63.29
<b>C2</b>	1147.9 ba	188.15
<b>C3</b>	729.2 b	293.59
<b>TA</b>	711.5 b	97.14
<b>PC</b>	824.0 b	159.96
<b>FQ</b>	2097.4 a	1035.95

Pr>F0.03; CV 42.49; HSD 1254.5, medias con la misma letra no son significativamente diferentes estadísticamente

#### 4.4. Caracterización Molecular

De las esporas que conforman cada uno de los consorcios evaluados en campo se realizó la extracción de ADN de esporas HMA usando las metodologías antes mencionadas en el apartado de extracción de esporas de HMA.



**Figura 4.** Marcador de talla molecular rango de separación 100-2000pb, tamaño de los fragmentos 550pb Productos de amplificación por PCR de la región de ADNr.

La amplificación del ADN de las muestras de esporas de HMA a 550pb (Figura 4) de ADN de las especies de las cuales se le realizó la secuenciación, obteniéndose que las longitudes de las secuencias fueran variables; éstas se determinaron de acuerdo con los "primers" utilizados (ITS'1, ITS'4). Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron los siguientes: las secuenciaciones se compararon de acuerdo

con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997); de acuerdo con el orden de alineamiento el ADN secuenciado en este estudio mostró una similitud de 100% con especies de hongos no micorrízicos (Cuadro 10). Estos resultados no fueron óptimos ya que la cantidad de amplificación del ADNr fue de 550 pb y se tienen reportes de amplificaciones superiores ADN de esporas de HMA a este número, otro de los factores aun más importante es que se han encontrado en el genoma de estos hongos secuencias con homología a "Long Terminal-Repeats" (LTRs). Esto se debe a que el estudio a nivel genético de estos hongos se complica porque se cuenta con indicios de que dentro de una misma espora, no todos sus núcleos son iguales, manifestándose polimorfismo a nivel del ADN ribosómico (Clapp *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a la condición multinucleada de las esporas de los hongos micorrízicos arbusculares, la fuente de ese polimorfismo intraesporal del ADNr, no está todavía clara. La variación intraesporal del ARNr podría estar contenida en su totalidad en un mismo núcleo individual (modelo homocariótico), o distribuida entre los diferentes núcleos (modelo heterocariótico) (Pawlowska y Taylor., 2002; Pawlowska., 2005).

Del mismo modo, resulta polémico el tipo de multiplicación nuclear, con evidencias tanto a favor del modelo clonal, como a favor de la recombinación entre núcleos (Rosendahl y Taylor., 1997; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001).

Otra característica de dicho genoma fúngico, es el bajo contenido de GC que forman parte del mismo, sólo el 30-35%, y casi el 25% de la cisteína esta metilada (Hosny *et al.*, 1997), siendo este porcentaje demasiado alto para algunos grupos de HMA. El estudio a nivel genético de estos hongos, se complica aún más si tenemos en cuenta indicios de que dentro de una misma espora, no todos sus núcleos son iguales, manifestándose polimorfismo a nivel del ARN ribosómico (Clapp *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a la estructura multinucleada de las esporas de los hongos micorrízicos arbusculares, la fuente de ese polimorfismo intraesporal del ADNr, no está todavía claro la existencia de secuencias de rRNA múltiples dentro de las esporas de HMA individuales y los altos niveles de variabilidad en los genes de estos simbioses

altamente conservados, con un gran número de copias han provocado una intensa polémica sobre la estructura genética de la clase Glomeromycota.

Últimamente, dos hipótesis se han propuesto para explicar el origen de esta variación, sobre todo, ya sean internuclear (multigenómico) o intranucleares (poliploidía) en la sangre.

Rodríguez *et al.*, 2004 menciona en su trabajo que hay evidencia reportada por numerosos autores que sugieren que la magnitud de la variación de la secuencia, y la presencia de esporas de una sola de las secuencias de los taxones aparentemente sin relación dentro de la Glomeromycota, hace que el uso de una o muy pocas secuencias, de sólo uno o dos aislados de HMA sea insuficiente para fines taxonómicos de algunos grupos de especies, a gran escala, un estudio sobre la variación genética en la HMA a través de diferentes genes podría ayudar a responder preguntas fundamentales sobre la biología y estructura genética de estos simbioses importantes.

La naturaleza polimórfica de secuencias de genes de ARN ribosomal en HMA fue descrito por primera vez por Sanders *et al.* (1995). Posteriormente, los estudios más informados a través de varias secuencias tanto variables (ITS) y las regiones conservadas (SSU y 5.8S) de los genes rRNA de HMA y entre las especies que pertenecen a géneros diferentes fueron realizadas por (Lloyd-MacGilp *et al.* 1996; Clapp *et al.*, 1999; Helgason *et al.* 1999; Hosny *et al.* 1999; Lanfranco *et al.* 1999; Antonioli *et al.* 2000, Pringle *et al.* 2000)

Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003 menciona que los estudios de las comunidades de HMA en el ambiente natural son difíciles, porque los HMA son simbioses obligados que no han sido cultivados axénicamente y se pueden identificar morfológicamente sólo en la etapa de espora. Sin embargo, el uso de marcadores moleculares, como el gen SSU rRNA evita la necesidad de clasificarlos de esta misma forma a como se hacía antes: las variantes de secuencia se pueden clasificar en filotipos (subtipos de secuencias estrechamente relacionadas, reforzando este resultado con el apoyo estadístico). La clase Glomeromycota es un subtipo antiguo, en el cual existe suficiente variación en el lugar de secuencias conservadas del gen SSU rRNA para ofrecer

filogenias bien resueltas (por ejemplo, Helgason et al 1998, 1999,.. Schüßler et al, 2001b; Vandenkoornhuyse et al, 2002). Existe una correlación entre los subtipos identificados por la filogenia molecular y la taxonomía tradicional, basada en la morfología de las esporas, pero está lejos de ser perfecto. Algunos taxones muy divergentes no se distinguían por los taxonomistas basándose en pruebas morfológicas (Morton y Redecker 2001), mientras que algunas especies se definen por caracteres morfológicos de superposición en la secuencia, y algunos aislados en las colecciones de cultivos parecen ser genéticamente heterogénea (Lloyd-MacGilp et al. 1996; Helgason et al. 2002).

**Cuadro 10.** Alineamientos significativos de secuencias de ADNr de HMA con respecto a otras especies fúngicas.

Acceso	Descripción	% Identidad
<a href="#">GU941393.1</a>	Uncultured eukaryote clone N302T_402 18S ribosomal RNA gene.	100%
<a href="#">HQ718417.1</a>	<i>Gibberella moniliformis</i> strain Gm3 18S ribosomal RNA gene.	100%
<a href="#">HQ829415.1</a>	<i>Gibberella</i> sp. Kashgar15 internal transcribed spacer.	100%
<a href="#">HQ630965.1</a>	<i>Fusarium</i> sp. 3 TMS-2011 voucher MS2-4 18S ribosomal RNA gene	100%
<a href="#">HQ637284.1</a>	<i>Gibberella moniliformis</i> strain JZ-37 18S ribosomal RNA gene	100%
<a href="#">HQ647306.1</a>	<i>Gibberella</i> sp. FppMV11 internal transcribed spacer.	100%
<a href="#">HQ384402.1</a>	<i>Gibberella moniliformis</i> strain FUS ITS 16 18S ribosomal RNA gene	100%
<a href="#">GU205431.1</a>	<i>Gibberella moniliformis</i> isolate A-149 internal transcribed spacer.	100%
<a href="#">GU205432.1</a>	<i>Gibberella moniliformis</i> isolate A-999 internal transcribed spacer.	100%
<a href="#">GU205426.1</a>	<i>Fusarium denticulatum</i> isolate 10763 internal transcribed spacer.	100%

A continuación se muestra el reporte taxonómico de las especies (Cuadro 11) que se alinearon de acuerdo al programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), partiendo de la secuenciación obtenida de la muestra de ADN de esporas:

```
CCATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCA
GAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCA
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAA
GCCCAGCTTGGTGTGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCGCCAAATTGATTGGC
GGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCG
CGGCCACGCCGTAAACCCCAA CTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA
CCCGCT
```

**Cuadro 11.** Rama taxonómica de las especies que se alinearon de acuerdo al programa BLAST.

Eukaryota .....	101 hits	37 orgs	[root; cellular organisms]
. Uncultured eukaryote .....	1 hits	1 orgs	[environmental samples]
. Fungi .....	100 hits	36 orgs	[Fungi/Metazoa group]
.. Ascomycota .....	85 hits	31 orgs	[Dikarya]
... Sordariomycetes .....	84 hits	30 orgs	[saccharomycetae; Pezizomycotina; leotiomyceta; sordariomyceta]
.... Hypocreales .....	83 hits	29 orgs	[Hypocreomycetidae]
..... Gibberella .....	66 hits	12 orgs	[Nectriaceae]
..... Gibberella moniliformis .....	41 hits	1 orgs	
..... Gibberella sp. Kashgar15 .....	1 hits	1 orgs	
..... Gibberella sp. FppMV11 .....	1 hits	1 orgs	
..... Gibberella fujikuroi complex .....	20 hits	6 orgs	
..... mitosporic Gibberella fujikuroi complex .....	11 hits	5 orgs	
..... Fusarium denticulatum .....	1 hits	1 orgs	
..... Fusarium subglutinans .....	7 hits	1 orgs	
..... Fusarium pseudonygamai .....	1 hits	1 orgs	
..... Fusarium pseudocircinatum .....	1 hits	1 orgs	
..... Fusarium bulbicola .....	1 hits	1 orgs	
..... Gibberella intermedia .....	9 hits	1 orgs	
..... Gibberella sp. FE 180 .....	1 hits	1 orgs	
..... Gibberella sacchari .....	1 hits	1 orgs	
..... Gibberella sp. F7 .....	1 hits	1 orgs	
..... Fusarium .....	17 hits	17 orgs	[mitosporic Hypocreales]
..... Fusarium sp. 3 TMS-2011 .....	1 hits	1 orgs	
..... Fusarium sp. Ljf001 .....	1 hits	1 orgs	
..... Fusarium sp. UP0121 .....	1 hits	1 orgs	
..... Fusarium sp. B03176 .....	1 hits	1 orgs	
..... Fusarium sp. TN186032 .....	1 hits	1 orgs	
..... Fusarium sp. O89085 .....	1 hits	1 orgs	

.....	Fusarium sp. AP7805 .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. G95006 .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. JJP-2009a .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. ATCC MYA-3973 .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. ATCC MYA-3972 .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. F14-2008 .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. VegaE1-24 .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. NRRL 43682 .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. NRRL 43658 .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. NRRL 43657 .....	1 hits	1 orgs
.....	Fusarium sp. NRRL 43656 .....	1 hits	1 orgs
....	Pestalotiopsis disseminata ...	1 hits	1 orgs [Xylariomycetidae; Xylariales; Amphisphaeriaceae; mitosporic Amphisphaeriaceae; Pestalotiopsis]
..	uncultured Ascomycota .....	1 hits	1 orgs [environmental samples]
..	environmental samples .....	12 hits	2 orgs
..	uncultured fungus .....	10 hits	1 orgs
..	uncultured endophytic fungus .....	2 hits	1 orgs
..	unclassified Fungi .....	3 hits	3 orgs
..	fungal sp. ARIZ B086 .....	1 hits	1 orgs
..	fungal endophyte sp. P1717C .....	1 hits	1 orgs
..	fungal endophyte .....	1 hits	1 orgs

## CONCLUSIONES

A pesar de la serie de disoluciones realizadas en el ensayo del numero más probable de propágulos cada en cada consorcio, los rendimientos en el número de esporas por 100 g de sustrato, fueron elevados

Una cantidad de inóculo en el suelo, al final del periodo de incubación tiende a formar una población de esporas que asegura la reproducción de su especie, sin tener relación directa con la cantidad inicial empleada.

Con respecto a la producción del inoculante el Acrisol, sin importar la condición de esterilidad, resultó ser el sustrato más favorable para reproducir esporas de HMA, utilizando como planta trampa maíz VS-536

El porcentaje de colonización de raíces de maíz por las esporas de HMA, fue mayor en Fluvisol no estéril (80%), seguido por Cachaza no estéril (77.9%). Los sustratos no estériles son más recomendables que los esterilizados para favorecer la colonización de raíces de maíz.

Con el número de esporas obtenido en este trabajo la fertilización química obtuvo el mayor número de esporas seguido del inoculante 2 el cual sería el más óptimo para su utilización en cultivo de maíz en suelos con problemas de acidez y de baja movilidad de nutrientes.

El consorcio C2 conformado por las especies de HMA: *Glomus sinuosum*, *Glomus ambisporum*, *Glomus rubiformis*, *Glomus caledonium*, *Glomus geosporum* y *Gigaspora gigantea*, obtuvo un rendimiento de grano de 1147.9 kg ha<sup>1</sup> con respecto a la base de datos de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2010), para el 2010 Huimanguillo obtuvo un rendimiento por ha en de 1.56 t, lo que demuestra la capacidad de nuestro consorcio para ser utilizado en la agricultura como un producto comercial que ayuda a la captación de nutrientes de baja movilidad en suelos de sabana al compararlo con la fertilización química con respecto a la variable de productividad este consorcio obtuvo buenos rendimientos.

En lo que respecta a la caracterización molecular no se pudo clasificar ninguna de las especies evaluadas debido a que los fragmentos amplificados fueron muy pequeños por lo que se sugiere la realización de amplificaciones más grandes a partir de 1000 ó 1500pb y poner énfasis en el cuidado del manejo del ADN para no contaminar las muestras, en nuestros resultados obtuvimos que los alineamientos realizados nos indican que nuestro ADN corresponde a especies de *Fusarium denticulatum*, *Gibberella moniliformis*, *Gibberella* sp.

## LITERATURA CITADA

- Abbott L.K. y A.D. Robson. 1991.** Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agric., Ecosystems and Environ.* 35: 124-150.
- Acton C.J., D.A. Rennie y E.A. Paul. 1963.** The relationship of polysaccharides to soil aggregation. *Can. J. Soil Sci.* 43:201-209.
- Allen B.E. 1995.** Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant Soil* 170: 447-462.
- Allen E.B., E. Rincón, M.F. Allen, A. Pérez-Jiménez, P. Huante, 1998.** Disturbance and seasonal dynamics of mycorrhizae in a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 30:261–274.
- Allen M. F. y Boosalis, M. G. 1983.** Effects of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerance of winter wheat. *New Phytol.* 93: 67-76.
- Allen M.F. 1991.** *The Ecology of Mycorrhizae.* Cambridge Univ.Press, Cambridge, UK, 184p.
- Allison F.E. 1968.** Soil aggregation: Some facts and fallacies as seen by a microbiologist. *Soil Sci.* 106: 136-143.
- Allison F.E. 1973.** *Soil organic matter and its role in crop production.* Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.
- Altschul S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Antoniolli Z.I., Schachtman, D.P., Ophel-Keller, K. & Smith, S.E. 2000.** Variation in rDNA ITS sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. *Mycological Research*, 104, 708-715.

- Aspiras R.B., O.N. Allen, G. Chesters y R.F. Harris. 1971.** Chemical and physical stability of microbial stabilized aggregates. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 35: 283-286.
- Atkinson D. 1973.** Some general effects of phosphorus deficiency on growth and development. *Plant Physiol.* 72, 101-111.
- Azcón R. 2000.** Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. In: *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular.* Mundi-Prensa, Mexico. 15 p.
- Azcón. A.C., J. M. BAREA. 1980.** "Micorrizas". *Investigación y Ciencia.* 47: 8-16.
- Azcón. A.C., Jaizme-Vega MC, Calvet C. 2002.** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In *Mycorrhizal technology in agriculture.* Birkhäuser Verlag, Germany, pp 187-197
- Azcón-Aguilar C., Bago B. 1994.** Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture. ALS, Birkhäuser, pp. 47-60
- Azcón-Aguilar C., Barea J.M. 1992.** Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En Allen MF (Ed.) *Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant Fungal Process.* Chapman & Hall. New York, EEUU. pp 163 - 198.
- Barea J.M y Jeffries P.J. 1995.** Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plants systems. In A Varma, B Hock, eds *Mycorrhiza.* Springer-Verlag, Berlin, pp 521-560.
- Barea J.M. 1998.** Biología de la rizósfera. *Investigación y Ciencia* 256: 74-81.
- Barker S.J, Tagu D. 2000.** The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *J Plant Growth Regul* 19:144–154.
- Barker S.; TAGU, D., y DELP, G. 1998.** Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiol.* 116:1201-1207.

- Barrera B., Silvia Eugenia. 2009.** El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. Facultad de ciencias agropecuarias. Vol 7. No 1.
- Baum C., F. Makeschin, 2000.** Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on mycorrhizal formation of two poplar clones (*Populus trichocarpa* and *P. tremula*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163: 491–497.
- Becard G, Pfeffer P.E. 1993.** Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174:62-68.
- Bellgard S.E. 1993.** The topsoil as the major store of propagules of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in southeast Australian sandstone soils. *Mycorrhiza* 3: 19–24.
- Bethlenfalvay G.J. 1992.** Mycorrhizae in the agricultural plant–soil system *Symbiosis* 14: 413–425.
- Boddington C.L. y Dodd J.C. 2000.** The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular Mycorrhizal fungi. I. Field studies in an Indonesian ultisol. *Plant and Soil* 218:137-144.
- Bolan N. S. 1991.** A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134:189-207.
- Boucher A., Y. Dalpe y C. Charest. 1999.** Effect of arbuscular mycorrhizal colonization of four species of *Glomus* on physiological responses of Maize. *Plant Nutr.* 2(4,5), 783-797.
- Brady N.C., y Weil R.R. 1999.** The nature and properties of soils. 20th ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ.
- Brundrett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grave y N. Malajczuk. 1996.** Working With Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian centre for International Agricultural Research. p43-135.

- Brundrett M. 1991.** Micorrizas in natural ecosystems. *Adv Ecology Research* 21: 171-313.
- Camargo-Ricalde S.L., S.S. Dhillon y R. Grether. 2002.** Community structure of endemic *Mimosa* species and environmental heterogeneity in a semi-arid Mexican valley. *J. Veg. Sci.* 13: 697-704.
- Chenu C. 1989.** Influence of a fungal polysaccharide, scleroglucan, on clay microstructures. *Soil Biol. Biochem.* 21: 299-305.
- Clapp J.P, Rodriguez A, Dodd J.C. 2001.** Inter- and intra-isolater RNA large subunit variation in *Glomus coronatum* spores. *New Phytol* 149:539–554.
- Clapp J.P., Young, J.P.W. y Fitter, A.H. 1999.** Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Molecular Ecology*, 8, 915-921.
- Clapperton M.J. y Reid D.M.. 1992.** A relationship between plant growth and increasing VA mycorrhizal inoculum density. *New Phytol.* 120: 227-234.
- Clark R.B. 1997.** Arbuscular Mycorrhizal Adaptación, Spore Germination, Root Colonization and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and soil* 192: 15-22p.
- Cooke J.C, Gemma J.N, Koske R.E. 1987.** Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 79:331-333.
- Da Silva, Jose y Cardoso, Elke. 2007.** Micorriza arbuscular em cupuaçu e pupunha cultivados em sistema agroforestal e em monocultivo na Amazônia Central. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41(5): 819-825..
- Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H. y Young J.P.W. 2001.** Molecular diversity of arbuscular Mycorrhizal fungi colonizing arable crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 203-209.
- Davies F.T, Potter J.R, Linderman R.G. 1992.** Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development on

pepper plants independent of plant size and nutrient content. *J. Plant Physiol.* 139: 289–294.

**Dodd J.C, Burton C.C, Burns R.G, Jeffries P. 1987.** Phosphatase activity associated with the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*107: 163-172.

**Dodd J.C., C.L. Boddington, Rodriguez A., González C., Chávez E .I., Mansur. 2000.** Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: Form, function and detection. *Plant Soil* 226: 131-151.

**Douds D.D. y P.D., Miller J.R.. 1999.** Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agr. Ecosyst. Environ.* 74: 77-93.

**Faber B. A., Zasoki R. J., Munns D. A. y Shackel K. 1991.** A method of measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. *Can. J. Bot.* 69:87-94.

**Ferraris N., Gustavo y Couretot A., Lucrecia. 2002.** Evaluación de la inoculación con micorrizas en maíz bajo diferentes ambientes de fertilidad. *Elsitioagrícola.com.*

**Fischer C.R, Janos D.P., Perry D.A., Linderman R.G, Sollins P. 1994.** Mycorrhiza inoculum potentials in tropical secondary succession. *Biotropica* 26:369-377.

**Fredeen A., I.M. Rao, y Ferry N. 1989.** Influence of phosphorous nutrition in *Glycine max.* *Plant Physiol.* 89, 225-230.

**Gadkar V., David-Schwartz R., Kunik T. y Kalpunik Y. 2001.** Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant Physiol.* 127:1493-1499.

**Gazey C, Abbott L.K, Robson A.D. 1993.** VA mycorrhizal spores from 3 species of *Acaulospora*—germination, longevity and hyphal growth. *Mycol Res* 97:785-790.

**Guadarrama P., Sanchez-Gallén I., Álvarez-Sanchez J., Ramos-Zapata J. 2004.** Hongos, plantas y beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares. *Ciencias* 73:38-45.

- Guadarrama Patricia., Castillo-Argüero Silvia., Ramos-Zapata José A., Camargo-Ricalde Sara L., Álvarez-Sánchez Javier. 2008.** Propagules of arbuscular mycorrhizal fungi in a secondary dry forest of Oaxaca, Mexico. *Rev. biol. trop.* Mar; 56(1): 269-277.
- Harley J.L. 1989.** The significance of mycorrhiza. *Mycol. Res.* 92: 129-139.
- Helgason T., Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H., Young J.P.W. 1998** Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394, 431.
- Helgason T, Merryweather J.W., Denison J., Wilson P., Young J.P.W., Fitter A.H. 2002.** Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*, **90**, 371–384.
- Helgason T., Fitter., A.H. y Young J.P.W. 1999.** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hya-cinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular Ecology*, 8, 659-666.
- Hijri M., y Sanders I.R., 2004.** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology* 41, 253–261.
- Hijri M., y Sanders I.R. 2005.** Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* 433, 160–163.
- Hosny M, de Barros J.P.P., Gianinazzi-Pearson V., Dulieu H. 1997.** Base composition of DNA from glomalean fungi: high amounts of methylated cytosine. *Fungal Genet Biol* 22:103-111
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H. 1998.** Nuclear DNA contents of eleven fungal species in Glomales. *Genome* 41:422–428 22:103–111.
- Janos D.P. 1996.** Mycorrhizas, succession and the rehabilitation of deforested lands in the humid tropics. In: Frankland, J.C., N. Magan, G.M. Gadd (eds.), *Fungi and environmental change*. Cambridge University, Cambridge. pp. 129–162.

- Jasper A. y Davy J.A. 1993.** Root characteristics of native plant species in relation to the benefit of mycorrhizal colonization for phosphorus uptake. *Plant Soil* 155/156: 281-284.
- Jeffries P. y Barea J. M. 2001.** Arbuscular micorriza- a key component of sustainable plant-soil ecosystems. En: Hock B. (ed.). *The Mycota IX. Fungal Associations.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 95-113.
- Joner E.J, Johansen A. 2000.** Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular Mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 104: 81-86.
- Kabir Z. I.P. O'Halloran y Hamel C. 1997.** The proliferation of fungal hyphae in soils supporting mycorrhizal and nonmycorrhizal plants. *Mycorrhiza* 6: 477-480.
- Kahiluoto H. 2000.** A Systems Approach to the Management of Arbuscular Mycorrhiza—Bioassay and Study of the Impact of Phosphorus Supply. Univ. of Helsinki, Dep. of Appl. Biol., Publ. 1, Helsinki.
- Khanam D., Miridha Mau., Solaiman Arm., Hossain T. 2006.** Effect of edaphic factor son root colonization and spore population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Bull. Ins. Trop. Agr., Kyushu Univ.;* 29:97-104.
- Kjöller R., Rosendahl S. 2000.** Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: Differential reponses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biology and Fertility of Soils* 31: 361–365.
- Klironomos J. N. 2003.** "Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi." *Ecology (Washington D C)* 84(9): 2292-2301.
- Kottke I., Haug I., Preußing M., Setaro S., Sua´rez J.P., Weiß M., Nebel M., Oberwinkler F. 2007.** Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology*, in press.
- Lanfranco L., Delpero M., y Bonfante P. 1999.** Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology*, 8, 37a5.

- Lanfranco L., Wyss P., Marzachi C., y Bonfante P. 1995.** Generation of RADP-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular Mycorrhizal fungus. Mol. Ecol. 4: 61-68.
- Lloyd-MacGilp S.A., Chambers S.M., Dodd J.C., Fitter A.H., Walker C. y Young J.P.W. 1996.** Diversity of the internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, 133, 103-111.
- Lovera M., Cuenca G. 2007.** Diversidad de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y potencial de micorrizas del suelo de forma natural y una sabana perturbada de la Gran Sabana, Venezuela. INTERCIENCIA. 32(2):108-114. 32 (2) :108-114.
- Marschner H. 1991.** Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. Plant Soil 134: 1–20.
- Marschner H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press. London, England.
- Marschner H. y Dell B. 1994.** Nutrient uptake in Mycorrhizal symbiosis. pp. 89-102. In: A.D. Robson, L.K. Abbott y N. Malujczuk (eds.). Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Mcgee P.A., Pattinson G.S., Heath R.A., y Newman C.A. 1997.** Survival of propágulos of arbuscular Mycorrhizal fungi in soils in eastern Australia used to grow cotton. New phytologist. 773-780.
- Mehta N.C., Streuli H., Muller M., y Deuel H. 1960.** Role of polysaccharides in soil aggregation. J. Sci. Food Agric. 11:40-47.
- Miller R.M., y Jastrow J.D. 1992.** The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. Special Publication 54. American Society of Agronomy. Madison, WI.
- Montaño A.N.M.A., Quiroz G.V., Cruz F.G. 2001.** Colonización Micorrízica Arbuscular y Fertilización Mineral de Genotipos de Maíz y Trigo Cultivados en un Andisol.

TERRA Latinoamericana, Octubre-diciembre, año/vol. 19, número 004  
Universidad Autónoma Chapingo, México.pp. 337-344

**Morton J.B., Redecker D. 2001.** Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, **93**, 181–195.

**Morton J.B. y Benny G.L. 1990.** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glominaeae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.

**Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mäder P., Boller T., Wiemken A. 2003.** Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystem of Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 69: 2816–2824.

**Osorio-Miranda M., Castelán-Estrada M., Hernández-Cuevas L y Salgado-García S. 2008.** Hongos Micorrícicos Arbusculares de los Suelos de Sabana de Tabasco. Memorias de la XX Reunión Científica-Tecnológica, Forestal y Agropecuaria Tabasco 2008. p 51-60.

**Palma – López D. J y A. Triano S. (Copms) 2002.** Plan de uso sustentable de los suelos de Tabasco, Volumen II. Ed. COLEGIO DE POSTGRADUADOS-ISPOTAB. Villahermosa Tabasco, Méx. 180p.

**Pawlowska T.E., Taylor J.W. 2002.** Organization of genetic variation within glomalean individuals. Proceedings of the 7th International Mycological Congress,Oslo, Norway.

**Pawlowska T.E. 2005.** Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* 251:185-192.

**Pearson V., Read D.J. 1975.** The physiology of the mycorrhizal endophyte of *Calluna vulgaris*. *Trans Br Mycol Soc* 64:1-7.

- Peck N., MacDonald G. y Barnard J. 1988.** Sweet corn seedling responses to band applied nitrogen, phosphorus and soil and potassium fertilizers. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.* 113, 336-342.
- Pedraza M.E.S. 1998.** Uso de hongos endomicorrizicos arbusculares de Plantas ornamentales propagadas in vitro. Tesis de maestría en ciencias, colegio de postgraduados, México. 14-35p.
- Pellerin S. y Mollier A. 2001.** How to include mineral nutrition in crop growth models? The example of phosphorus on maize: Plant nutrition food security and sustainability of agro-ecosystems. Kluwer Academic Publishers. pp. 110-111.
- Peña-Venegas, C.P., Cardona Gladys Inés., Arguelles Jorge Humberto y Arcos Adriana Lucia. 2007.** Micorrizas arbusculares del sur de la Amazonia colombiana y su relación con algunos factores fisicoquímicos y biológicos del suelo. vol.37, pp. 327-336.
- Peterson R.L., Massicotte H.B., Melville L.H. . 2004.** Micorrizas: Anatomía y Biología Celular .NRC Investigación Press. ISBN 0-660-19087-7.
- Phillips J.M., Hayman D.S. 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158–160.
- Porter W.M. 1979.** The "Most Probable Number" Method for Enumerating Infective Propagules of vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Soil. *Aust. J. Soil Res.* 17: 515-519.

- Portilla C., I., Molina G E., Cruz-Flores G., Ortíz-Monasterio I., y Manske G.G.B. 1998.** Colonización micorrízica arbuscular, actividad fosfatásica y longitud radical como respuesta a estrés de fósforo en trigo y triticale cultivados en un Andisol. *Terra* 16: 55-61.
- Pringle A., Moncalvo J.M. y Vilgalys R. 2000.** High levels of variation in ribosomal DNA sequences within and among spores of a natural population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora colossica*. *Mycologia*, 92, 259-268.
- Quilambo O. 2003.** The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Afr. J. Biotechnol.* 2(12): 539-546.
- Rao I.M., y Ferry N. 1989.** Leaf phosphorus status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet. *Plant Physiol.* 90, 814-819.
- Requena N., Pérez-Solis E., Azcón-Aguilar C., Jeffries P., Barea J.M. 2001.** Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl Envir Microbiol* 67(2):495-498.
- Rodrigues A., Peter J.C., y Charles J.D. 2004.** Ribosomal RNA gene sequence diversity in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Journal of Ecology* 92, 986-989.
- Rosendahl D., Taylor J.W. 1997.** Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLPTM. *Mol Ecol* 6:821-829.
- Roveda G., Rojas A., Ramírez M., Alegría E., Corredor G. 1998.** Efecto de la asociación micorrízica con plantas de maíz bajo condiciones de suelos de los Llanos Orientales de Colombia. *Memorias IX Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo. Paipa, Boyacá. Octubre 21-24, pp.211-215.*
- Roveda Gabriel y Polo Cristina. 2007.** Mecanismos de adaptación de maíz asociado a *Glomus* spp. En suelos con bajo fósforo disponible. *Agron. colomb.*, vol.25, n.2, pp. 349-356. ISSN 0120-9965.

- Ruiz-Lozano J.M. 2003.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13:309-317.
- Russo V.M. y A.J. Pappelis. 1995.** Senescence in sweet corn as influenced by phosphorous nutrition. *Plant Nutr.* 18(4), 707-717.
- Sanders I.R., Clapp J.P., Wiemken A. 1996.** The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 133:123-134.
- Santos-González J.C., Finlay R.D. y Tehler A. 2007.** Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. *Appl Environ Microbiol* 73(17), 5613-5623.
- Schalamuk S., Cabello M. 2010.** Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on Glomeromycota diversity. *Mycologia* 102: 261–268.
- Schüßler A., Schwartzott A. y Walker C. 2001.** A New Fungal Phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and Evolution. *Mycological Research* 105(12): 1413-1421.
- Serralde A.M., Ramírez M.M. 2004.** Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos. *Revista Corpoica* 5(1): 31-40.
- SIAP.2010.** [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&layout=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&layout=351). Consultado 11/08/2011.
- Sieverding E. 1986.** Influence of soil water regimes on VA mycorrhiza. IV. Effect on root growth and water relations of *Sorghum bicolor*. - *J. Agron. Crop Sci.* 157: 36-42.
- Sieverding E. 1991.** Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Technical Cooperation Eschborn. Federal Republic of Germany. 1769 p.

- Simard S.W., Perry D.A., Jones M.D., Myrold D.D., Durall D.M., Molina R. 1997.** Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579-582.
- Siqueira J.O., Colozzi Filho A., y Oliveira E. 1989.** Ocorrência de micorrizas vesículo-arbusculares em agro e ecossistemas naturais do estado de Minas Gerais. *Pesqui. Agropecu. bras*, 24:1499-1506.
- Smith M.R., Charvat I., Jacobson R.L. 1998.** Arbuscular mycorrhizae promote establishment of prairie species in a tallgrass prairie restoration. *Can J Bot* 76:1947–1954.
- Smith S., y Read D.A. 1997.** Mycorrhizal symbiosis. Academic press. Gran Bretaña. 605 pp.
- Smith S.E. 1966.** Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol* 65:488-499.
- Smith S. E., y Gianinazzi-Pearson V. 1988.** Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 221-244.
- Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V., Koide R. y Cairney J.W.G. 1994.** Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. pp. 103-113. In: A.D. Robson, L.K. Abbott y N. Malujczuk (eds.). *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry.* Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- St John B.J., Smith S.E., Nicholas D.J.D., Smith F.A. 1985.** Enzymes of ammonium assimilation in the mycorrhizal fungus *Pezizella ericae* Read. *New Phytologist* 100: 579–584.
- Strack D., Fester T., Hause B., Schliemann W., Walter M.H. 2003.** Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical and molecular aspects. *J. Chem. Ecol.* 29:1955-1979.

- Stukenbrock E.H., Rosendahl S. 2005.** Distribution of dominant arbuscular mycorrhizal fungi among five plant species in undisturbed vegetation of a coast grassland. *Mycorrhiza* 15(7):497-503.
- Tisdall J.M. 1991.** Fungal byphac and siruciural stability of soil. *Aust. J. Soil Res.* 29: 729-743.
- Tisdall J.M., y Oades J.M. 1980.** The effect of crop rotation on aggregation in a red-brown earth. *Aust. J. Soil Res.* 18:423-433.
- Urdaneta P., y Roveda G. 1999.** Efecto de las prácticas agronómicas (adición de P y micorrizas arbusculares) en plantas de maíz (*Zea mays* L.) en suelos ácidos de Colombia. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Biología. Octubre 1999.
- Uribe V., Gabriel., Petit Judith y Dzib E., Roberto. 2007.** Respuesta del Cultivo de Maíz a la Aplicación de Biofertilizantes en el Sistema Roza, Tumba y Quema en Suelo Alfisol (Chac-lu'um, Nomenclatura Maya), en Yucatán, México. *Agricultura Andina*. Volumen 13. Julio - Diciembre 2007.
- Uribe Valle., Gabriel., Dzib Echeverria., y Roberto. 2006.** Micorriza arbuscular (*Glomus intraradices*), *Azospirillum brasilense* y Brassinoesteroide en la producción de maíz en suelo luvisol. *Agric. Téc. Méx.* 2006, vol.32, n.1, pp. 67-76.
- Van Tichelen KK., Colpaert J.V., Vangronsveld J. 2001.** Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytol* 150(1):203-213.
- Vandenkoornhuysen P., Husband R., Daniell T.J. 2002.** Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*, 11,1555–1564.
- Vandenkoornhuysen P., Leyval C., Bonnin I. 2001.** High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity* 87:243-253.

**Vandenkoornhuyse P., Ridgway K. P., Watson I.J., Fitter A.H. y Young J.P.W.2003.**Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* **12**, 3085–3095.