



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

RESPUESTA MORFO/FISIOLÓGICA Y EXPRESIÓN
DE GENES *Pht1* DE CUATRO CULTIVARES DE *Zea
mays* L. INOCULADOS CON HONGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES BAJO DOS
CONCENTRACIONES DE FÓSFORO INORGÁNICO

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Agricultura Sustentable)

Presenta

SERGIO DAVID VALERIO LANDA

La Paz, Baja California Sur, diciembre de 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 23 del Mes de Noviembre del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., a liberar la tesis de grado titulada:

Respuesta morfo/fisiológica y expresión de genes *Pht1* de cuatro cultivares de *Zea mays* L. inoculados con hongos micorrízicos arbusculares bajo dos concentraciones de fosforo inorgánico

Presentada por el alumno: **SERGIO DAVID VALERIO LANDA**

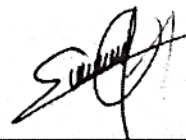
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **AGRICULTURA SUSTENTABLE**.

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



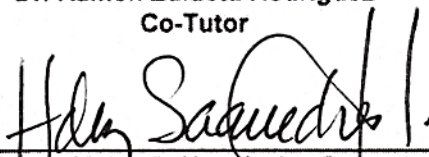
Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Director de Tesis



Dra. Evangelina Quiñones Aguilar
Co-Tutor



Dr. Ramón Zulueta Rodríguez
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel (CIBNOR) Director de tesis

Dra. Evangelina Quiñones Aguilar (CIATEJ) Tutor de tesis

Dr. Ramón Zulueta Rodríguez (FCA-UV-CX) Tutor de tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Dra. Evangelina Quiñones Aguilar

Dr. Ramón Zulueta Rodríguez

Jurado del Examen

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Dra. Evangelina Quiñones Aguilar

Dr. Ramón Zulueta Rodríguez

Suplentes

Dr. Bernardo Murillo Amador

Resumen

El problema de la baja disponibilidad de fosfato inorgánico (P_i) en los suelos ocasiona una disminución en los índices de producción del cultivo de *Zea mays* L., debido a esto se vuelve necesario la búsqueda de nuevas tecnologías dirigidas a mejorar la absorción de P_i al mismo tiempo que sean sustentables en el ambiente. La simbiosis de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) con raíces de plantas ha mostrado participar de manera activa en la nutrición de P_i . En contraste, la evidencia de los últimos años ha establecido la existencia de una diversidad funcional entre las posibles combinaciones de plantas huéspedes y hongos hospederos, y el ambiente en el que se desarrollan. Factores como la morfofisiología, estado nutricional, expresión de genes y la eficiencia simbiótica, son algunos de los parámetros que se han visto modificados. Durante este trabajo nosotros investigamos la diversidad funcional en la respuesta morfo/fisiológica y la expresión de genes *Pht1* de cuatro cultivares de maíz asociados a HMA (*Claroideoglossum etunicatum*) que se desarrollaron en concentraciones limitantes y altas de P_i . Nuestros resultados indicaron diferentes niveles de respuesta al crecimiento y modificación fisiológica entre cultivares maíz, los cuales estuvieron en función de las concentraciones altas y limitantes de P_i , el estatus de colonización de HMA o la interacción entre los dos factores. De manera similar, entre cultivares se observó una variación en el nivel de regulación de los genes *ZEAm;Pht1;3* y *ZEAm;Pht1;6*, esto en función de la interacción entre factores. Los cultivares 3 y 4 mostraron una mayor plasticidad fenotípica tanto a las respuestas de crecimiento como a las de modificación fisiológica. Por otro lado, plantas de maíz colonizadas por HMA a los 75 DDT mantuvieron un incremento en variables del crecimiento como el área y peso de hojas (8.25 y 6.1 %, respectivamente), mientras que redujeron hasta en un 10 % el peso seco de la raíz. Es muy probable que estas modificaciones formen parte de un mecanismo en que raíces asociadas a HMA reducen el gasto energético y de carbono utilizado en el desarrollo de raíces largas, sustituyéndolo por el micelio extra-radical de HMA. Así mismo, una mayor cantidad de biomasa aérea podría estar ligada a una respuesta de las plantas por aumentar la capacidad de fotosíntesis y las síntesis de compuestos de carbono que son necesarios para mantener la simbiosis con HMA. Los resultados de esta investigación contribuirán significativamente a elucidar los patrones de diversidad funcional asociados a la morfo/fisiología y expresión de genes *Pht1* entre plantas huéspedes de una misma especie y HMA.


Vo. Bo. Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Summary

The problem of the low availability of inorganic phosphate (P_i) in the soils causes a decrease in the production rates of the *Zea mays* L. crop, due to this it becomes necessary the search for new technologies aimed at improving the absorption of P_i while that are sustainable in the environment. The symbiosis of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) with plant roots has been shown to participate actively in the nutrition of P_i . In contrast, the evidence from recent years has established the existence of a functional diversity between the possible combinations of host plants and host fungi, and the environment in which they develop. Factors such as morpho/physiology, nutritional status, gene expression and symbiotic efficiency are some of the parameters that have been modified. During this work, we investigated the functional diversity in the morpho/physiological response and the expression of *Pht1* genes from four maize cultivars associated with AMF (*Claroideoglossum etunicatum*), which developed at the limiting and high concentrations of P_i . Our results indicated different levels of growth responses and physiological changes among maize cultivars, which were based on the high and limiting concentrations of P_i , the colonization status of AMF or the interaction between the two factors. Similarly, between cultivars a variation in the regulation level of the genes *ZEAm;Pht1;3* and *ZEAm;Pht1;6*, was observed, depending on the interaction between factors. Particularly, cultivars 3 and 4 showed higher phenotypic plasticity to both growth and physiological modification responses. On the other hand, maize plants colonized by AMF at 75 DDT maintained an increase in growth variables such as area and weight leaf (8.25 and 6.1 %, respectively), while reducing the dry weight of the root by up to 10 %. Probably these modifications are part of a mechanism in which AMF-associated roots reduce the energy and carbon expenditure used in the development of long roots, replacing it with the extra-radical mycelium of AMF. Likewise, a higher amount of aerial biomass could be linked to a response of plants by increasing the capacity of photosynthesis and the synthesis of carbon compounds that are necessary to maintain the symbiosis with AMF. The results of this research will contribute significantly to elucidate the patterns of functional diversity associated with the morpho/physiology and expression of *Pht1* genes, between host plants of the same species and HA.


Vo. Bo. Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia, en especial a mi madre Claudina, a mi padre Sergio, a mi hermana Teresa y a mi hermano Francisco. Quienes conmigo han sabido compartir una relación de familia a distancia, brindado de forma incondicional su apoyo, amor y comprensión a lo largo de estos años.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca N° 336561 para la realización de estos estudios de posgrado. Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) como instituto receptor que me permitió llevar a cabo mis estudios de la Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo, y Preservación de los Recursos Naturales.

A mi director de tesis el Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel, y a mis asesores la Dra. Evangelina Quiñones Aguilar y el Dr. Ramón Zulueta Rodríguez. A todos ellos gracias por brindarme su apoyo, conocimiento y consejos para la elaboración de mi trabajo de tesis.

Al personal del Posgrado, en especial a la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, a la Lic. Leticia González Rubio Rivera, Jefa del Departamento de Becas y Apoyo Estudiantil, a Tania Verónica Núñez Valdez, Secretaria del Depto. de Control Escolar, a Horacio Sandoval Gómez, Responsable del Laboratorio de Cómputo del Posgrado y a José Manuel Melero Astorga, Responsable de la Base de Datos Integral de Posgrado. A todos ellos gracias por las facilidades otorgadas para el desarrollo de mis actividades académicas.

Al Laboratorio de Fitopatología y a su técnico encargado Martín Guadalupe de Jesús Aguilar García. Al Laboratorio de Fisiología Comparada y a su técnico encargado Patricia Hinojosa Baltazar. Al Laboratorio de Microscopía Electrónica y a su técnico encargado Ariel Arturo Cruz Villacorta. Al Laboratorio de Fisiotécnica Vegetal y a sus técnicos encargados María del Carmen Mercado Guido y Lidia Hirales Lucero. Al Laboratorio de Microbiología Ambiental y a su técnico encargado Manuel Moreno Legorreta, y al personal técnico del Campo Agrícola Experimental “El Comitán”. A todos ellos les doy gracias por los apoyos brindados en cuanto a infraestructura, facilidades de materiales y equipos, capacitaciones otorgadas y el apoyo brindado para el desarrollo pleno de mis actividades de tesis de maestría.

De igual manera agradezco al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), en especial al Dr. Gabriel Rincón Enríquez y la Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez, por su apoyo y enseñanzas otorgadas durante mi estancia de investigación en este centro. También a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana-Campus Xalapa (FCA-UV-CX) en especial a la M.C. Liliana Lara Capistrán por su apoyo con la donación del material biológico para el desarrollo de mis experimentos.

Finalmente, y sin restar importancia agradezco a mis compañeros y amigos de la maestría, en especial a Ruby, Ylenia, Crystal, Salma, Anais, Hamid, Eric, Salvador y Ricardo, miembros del “Yonpol Evardeen”, y a mis amigas, Rocio con C y mi Romiee Elizabeth.

A todos muchas gracias por el aprecio, los consejos y momentos de alegría brindados.

Contenido

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS	i
Conformación de Comités	ii
Resumen	iii
Summary	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Contenido	viii
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xiii
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. La importancia del cultivo de Maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	14
1.2. Importancia del fósforo en las plantas.....	14
1.3. Estrategias de las plantas para incrementar la absorción de Pi.....	15
1.4. Hongos Micorrízicos Arbusculares.....	16
1.5. Vías y mecanismos de absorción del Pi.....	18
1.6. Genes Pht1 y su implicación en el transporte de Pi en plantas.....	19
2. ANTECEDENTES	22
2.1. Respuesta entre plantas y HMA.....	22
2.2. Expresión de genes Pht1 inducidos por HMA.....	22
2.3. Genes Pht1 en plantas de <i>Zea mays</i>	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPOTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos particulares.....	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1. Establecimiento del bioensayo.....	29
6.2. Evaluación de variables morfo-métricas y fisiológicas.....	31
6.3. Evaluación de variables microbiológicas.....	32
6.4. Análisis de la expresión relativa de genes Pht1 en raíces de <i>Zea mays</i>	34
6.5. Diseño experimental y Análisis Estadístico.....	36
7. RESULTADOS	38
7.1. Respuesta del crecimiento vegetal.....	38
7.1.1. Respuesta del crecimiento vegetal entre factores.....	38
7.1.2. Respuesta de crecimiento vegetal por la interacción entre factores....	39
7.1.3. Respuesta del crecimiento vegetal entre tratamientos.....	46
7.2. Respuesta de modificación fisiológica.....	54
7.2.1. Modificación fisiología vegetal entre factores.....	54
7.2.2. Modificación fisiológica vegetal por la interacción entre factores.....	54
7.2.3. Respuesta de modificación fisiológica vegetal entre tratamientos.....	60
7.3. Respuesta de variables microbiológicas.....	66
7.3.1. Variables microbiológicas entre factores.....	66
7.3.2. Variables microbiológicas por la interacción entre factores.....	66
7.3.3. Variables microbiológicas entre tratamientos.....	66
7.4. Cambio en el nivel de expresión relativa de genes Pht1.....	73

8. DISCUSIÓN	83
9. CONCLUSIONES	96
10. LITERATURA CITADA	98

Lista de figuras

Figura 1. Diferentes pasos de la colonización de HMA en raíces y vías de absorción de fosfato.....	18
Figura 2. Mecanismo de transporte de P_i a través de la membrana plasmática ..	19
Figura 3. Predicción topología transmembranal de los transportadores Pht1 (a) y posible mecanismo co-transportador de protón y fosfato a través de transportador de Pht1 (b).	20
Figura 4. Árbol filogenético de varios transportadores de fosfato de plantas y hongos.	23
Figura 5. Casa sombra con malla anti-áfidos utilizada para el establecimiento del bio-ensayo (a); mapa de las instalaciones principales del CIBNOR (b) y la ubicación del campo agrícola experimental.	29
Figura 6. Diferencias de las semillas de los cultivares de maíz obtenidos para el establecimiento de este bioensayo.	30
Figura 7. Esporas de HMA de <i>Claroideoglossum etunicatum</i> presente en el inóculo "CeUV-01".....	30
Figura 8. Área de hojas (cm^2) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de P_i y b) condición de HMA.	41
Figura 9. Área de hojas (cm^2) y longitud de raíz (cm) a los 75 DDT para los factores: a) cultivar de maíz y b) concentración de P_i	41
Figura 10. Longitud de raíces (cm) a los 75 DDT para los factores: a) condición de HMA y b) cultivar de maíz.	42
Figura 11. Peso seco de tallos (a) y peso seco de raíz (b) a los 75 DDT para el factor cultivar de maíz.	42
Figura 12. Peso seco de hojas (g) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de P_i y b) condición de HMA.....	43
Figura 13. Peso seco de hojas (a) y biomasa seca aérea (b) a los 75 DDT para el factor cultivar de maíz.	43
Figura 14. Biomasa seca total (g) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de P_i y b) cultivar de maíz.	44
Figura 15. Peso seco de raíz (g) entre la interacción de los factores A*C (a); Longitud de raíz (cm) entre la interacción de los factores B*C (b).	44
Figura 16. Peso seco de hojas (a) y biomasa seca total (b) entre las interacciones de los factores B*C.	45
Figura 17. Respuesta de crecimiento de plantas de maíz a los 75 DDT. Se evaluaron dos concentraciones de P_i (1 y 0.01 mM) y dos condiciones de HMA (con y sin).....	46
Figura 18. Área de hojas (cm^2) entre la combinación de tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).....	50
Figura 19. Longitud de raíz (cm) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	50
Figura 20. Peso seco de tallos (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	51
Figura 21. Peso seco de hojas (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	51

Figura 22. Peso seco de raíz (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	52
Figura 23. Biomasa seca aérea (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	52
Figura 24. Biomasa seca total (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	53
Figura 25. Índice de verdor (U. SPAD) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de Pi y b) condición de HMA.....	57
Figura 26. Tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (a) y conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (b) a los 75 DDT para el factor cultivar de maíz.	57
Figura 27. Tasa transpiratoria ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para el factor cultivar de maíz (a); Tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) entre la interacción de los factores A*C (b). .	58
Figura 28. Clorofila total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre la interacción de los factores: a) A*C, y b) B*C.....	58
Figura 29. Potencial hídrico foliar ($\psi = -\text{Mpa}$) entre la interacción de los factores: a) A*C, y b) B*C.	59
Figura 30. Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (a) y tasa transpiratoria ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (b) entre la interacción de factores A*C.	59
Figura 31. Clorofila total ($\mu\text{g/cm}^2$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	63
Figura 32. Índice de verdor (U. SPAD) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	63
Figura 33. Potencial hídrico foliar ($\psi = -\text{Mpa}$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).....	64
Figura 34. Tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).....	64
Figura 35. Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).....	65
Figura 36. Tasa transpiratoria ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).....	65
Figura 37. Colonización del HMA <i>Claroideoglomus etunicatum</i> en raíces de plantas de maíz a los 75 DDT (a y b); raíces de plantas de maíz sin colonización de HMA a los 75 DDT (c y d).	68
Figura 38. Colonización de HMA (%) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de Pi y b) condición de HMA.....	70
Figura 39. N° de esporas (10 g/suelo) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de Pi y b) condición de HMA.....	70
Figura 40. Interacción entre los factores B*C para las variables: a) colonización de HMA (%), y b) N° de esporas (10 g/suelo).	71
Figura 41. Colonización de HMA (%) entre los tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	71
Figura 42. N° de esporas (10 g/suelo) entre los tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4).	72
Figura 43. Cambio de expresión relativa del gen <i>ZEAm_a;Pht1;3</i> y <i>ZEAm_a;Pht1;6.</i> , para: a) concentración de Pi y b) condición de HMA.	76
Figura 44. En tratamientos se indica el cambio de expresión relativa del gen <i>ZEAm_a;Pht1;3</i> y <i>ZEAm_a;Pht1;6.</i>	76

- Figura 45.** Cambio de expresión relativa del gen *ZEAm_a;Pht1;3* entre tratamientos de cada uno de los cultivares de maíz. 77
- Figura 46.** Cambio de expresión relativa del gen *ZEAm_a;Pht1;6* entre tratamientos de cada uno de los cultivares de maíz. 77
- Figura 47.** Modelo lineal ajustado entre las variables: a) biomasa seca total (g) y área de hojas (cm²); b) biomasa seca total (g) y peso seco de tallos (g). 79
- Figura 48.** Modelo lineal ajustado entre las variables: a) biomasa seca total (g) y peso seco de hojas (g); b) biomasa seca total (g) y peso seco de raíz (g). 79
- Figura 49.** Modelo lineal ajustado entre las variables: a) biomasa seca total (g) y biomasa seca aérea (g); b) LOG₁₀[Biomasa seca total (g)] y LOG₁₀[Longitud de raíz (cm)]. 80
- Figura 50.** Modelo lineal ajustado entre las variables: a) conductancia estomática (mol H₂O m⁻² s⁻¹) y tasa fotosintética (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); b) tasa transpiratoria (mmol H₂O m⁻² s⁻¹) y tasa fotosintética (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹). 80
- Figura 51.** Modelo lineal ajustado entre las variables: a) tasa transpiratoria (mmol H₂O m⁻² s⁻¹) y conductancia estomática (mol H₂O m⁻² s⁻¹); b) índice de verdor (U.SPAD) y clorofila total (μg mL⁻¹). 81
- Figura 52.** Modelo lineal ajustado entre las variables: a) número de esporas (10 g/suelo) y colonización de HMA (%); b) LOG₁₀[Longitud de raíz (cm)] y LOG₁₀[Peso seco de raíz (g)]. 81
- Figura 53.** Modelo lineal ajustado entre las variables: a) potencial hídrico foliar (Mpa) y peso seco de raíz (g); b) LOG₁₀[Pht1;6]+10 y LOG₁₀[Pht1;3]+10. 82

Lista de tablas

Tabla I. Genes de la familia Pht1 en plantas de <i>Z. mays</i>	25
Tabla II. Lista de cebadores para los genes Pht1 y genes constitutivos utilizados en el ensayo de RT-qPCR ¹	35
Tabla III. Análisis factorial del crecimiento vegetal de maíz a los 75 DDT ¹	40
Tabla IV. Respuesta entre tratamiento del crecimiento vegetal de maíz a los 75 DDT.....	49
Tabla V. Análisis factorial de la modificación fisiología de maíz a los 75 DDT.	56
Tabla VI. Respuesta entre tratamientos de la modificación fisiología de maíz a los 75 DDT ¹	62
Tabla VII. Análisis factorial de variables microbiológicas en maíz a los 75 DDT. .	69
Tabla VIII. Respuesta entre tratamientos de variables microbiológicas en maíz a los 75 DDT.....	69
Tabla IX. Cambio en el nivel de expresión relativa de los genes <i>ZEAm;Pht1;3</i> y <i>ZEAm;Pht1;6</i> en tejido de raíz a los 75 DDT ¹	75
Tabla X. Análisis de correlación por rangos de Sperman entre variables microbiológicas, morfométricas, fisiológicas y de expresión de genes.	78

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La importancia del cultivo de Maíz (*Zea mays* L.)

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, la producción de maíz para el ciclo anual del 2013 fue de 1,017,536,854.00 ton ubicándose como el segundo cultivo de mayor producción a nivel mundial, particularmente México se situó como el séptimo país productor de este grano por detrás de Estados Unidos, China Continental, Brasil, Argentina, Ucrania e India (FAOSTAT, 2016) con una producción para el 2015 de 24,694,046.25 ton con un valor de 84,523,647.45 pesos mexicanos, colocándose como el principal cultivo a nivel nacional con el 19.03 % del valor de participación total (SIAP, 2016). Una de las principales limitaciones en la producción de maíz es la baja disponibilidad de fósforo en los suelos, problema que es generalizado en los suelos ácidos de las regiones tropicales/subtropicales y los suelos calcáreos de las regiones templadas (Calderon-Vazquez *et al.*, 2008), suelos predominantes en México y donde este importante cultivo es producido en mayor medida.

1.2. Importancia del fósforo en las plantas

En las plantas el fósforo (P) puede representar del 0.1 al 0.5 % de la biomasa seca total, por ello es considerado uno de los tres principales macro nutrientes junto con el nitrógeno (N) y el potasio (K) (Cordell *et al.*, 2009; Nussaume *et al.*, 2011). El P es un elemento esencial por estar involucrado en factores clave de la vida de los organismos ya sea por participar en la síntesis de componentes estructurales como; ácidos nucleicos, fosfolípidos y membranas, por contribuir en el metabolismo energético mediante la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP), asimismo formar parte de las cascadas de transducción de señales y es una molécula reguladora en la activación/inactivación de enzimas (Rausch y Bucher, 2002; Vance *et al.*, 2003; Ceasar *et al.*, 2014). El fosfato en su forma inorgánica (HPO_4 o H_2PO_4 , *Pi*, abreviatura para cualquiera de sus formas inorgánicas) es la fuente principal de asimilación en plantas (Walder *et al.*, 2015). El *Pi* es un elemento de muy baja movilidad y disponibilidad en los suelos, siendo un factor

limitante en los índices de producción agrícola de todo el mundo (Hinsinger *et al.*, 2001; Bucher, 2007; Richardson *et al.*, 2011). Entre los principales factores que influyen sobre la disponibilidad P_i esta; la retención de los iones de fosfato por partículas del suelo cargadas positivamente (óxidos de minerales y arcillas), su precipitación en complejos minerales resultado de la combinación con metales del suelo (Ca, Fe y Al), el potencial de Hidrogeno de la solución del suelo (pH), y la concentraciones de aniones que compiten con los iones de fosfato para las reacciones de intercambio de ligandos (Hinsinger *et al.*, 2001).

Ante la baja disponibilidad de P_i en los suelos y con el fin de contribuir a la demanda y seguridad alimentaria actual, la agricultura convencional se ha vuelto dependiente del suministro de fertilizantes fosfatados derivados en su mayoría de las minas de roca fosfórica (Richardson *et al.*, 2011). Sin embargo, las reservas actuales son un recurso no renovable que de acuerdo a los índices de consumo existentes se prevé agotaran en los próximos 100 años (Cordell *et al.*, 2009). Sumado a esto, gran parte de los fertilizantes fosfatados que son incorporados a los suelos se pierden por lixiviación y escorrentía (Hinsinger *et al.*, 2001), además de existir un poco interés en el uso sostenible de este recurso.

1.3. Estrategias de las plantas para incrementar la absorción de P_i

Dentro de la solución del suelo el P_i es un nutriente de baja disponibilidad, debido a las propiedades físico-químicas de este elemento y la de los suelos (Ticconi y Abel, 2004). Generalmente las concentraciones de P_i en el suelo van de 0.1-10 μM , mientras que los niveles óptimos de consumo de las plantas suelen estar en los rangos mM (Hinsinger, 2001; Javot *et al.*, 2007). Por otro lado, la tasa de absorción de P_i de las plantas por lo general es superior a la velocidad de difusión de este elemento en el suelo, lo que propicia la rápida formación de una zona de agotamiento en la periferia de la raíz y como consecuencia limita la tasa de absorción directa (Bucher, 2007).

Ante la problemática de la baja movilidad química y disponibilidad de P_i en la solución del suelo, las plantas han desarrollado diferentes adaptaciones para

aumentar la absorción de este elemento. De acuerdo con Javot *et al.* (2007) destacan tres principales estrategias; la primera se basa en un incremento en la longitud de las raíces laterales y el número de pelos radicales que exploran el volumen de suelo más allá de las zonas de agotamiento. La segunda consiste en la exudación de compuestos movilizadores de P como; ácidos orgánicos (malato y citrato), fosfatasas y protones. Estos, son capaces de liberar el P_i fijado de complejos y cationes quelantes, también compiten con los iones de fosfato por los sitios de sorción, mineralizan P_i de compuestos orgánicos por desfosforilación, e incrementan la disolución de P_i al acidificar la rizósfera en suelos alcalinos (Javot *et al.*, 2007; Ramaekers *et al.*, 2010). La tercera estrategia es la formación de asociaciones simbióticas con diferentes microorganismos de suelo como; rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), estos últimos participan de manera activa en la nutrición de P_i de las plantas huéspedes al incrementan la absorción de este nutriente por medio de su micelio extra-radical que crece más allá de las zonas de agotamiento.

1.4. Hongos Micorrízicos Arbusculares

El término micorriza denomina la asociación simbiótica entre las raíces de las plantas con las hifas de hongos del *Phylum* Glomeromycota (Redecker *et al.*, 2013), actualmente se estima que más del 80 % de las plantas vasculares pueden establecer esta endosimbiosis como resultado de un proceso co-evolutivo y que de acuerdo a registros fósiles data desde hace más de 450 millones de años aproximadamente (Bonfante y Desirò, 2015).

Los HMA son organismos biotróficos obligados, es decir necesitan de un hospedero vivo para completar su ciclo de vida. La base de esta relación simbiótica está en el flujo bidireccional de nutrientes, donde, elementos como P_i , nitrógeno en forma de amonio o nitrato (NH_4^+ y NO_3^-) y aminoácidos (AA), son tomados de la solución del suelo por las hifas del micelio extra-radical de los HMA y exportados a las plantas mediante la interfaz simbiótica que mantienen con las células de la raíz, a su vez, de la planta se importan fuentes de carbón hacia el

hongo el cual utiliza para la síntesis de sus lípidos y membranas (Parniske, 2008; Bonfante y Genre, 2010).

El establecimiento, desarrollo y funcionamiento de la simbiosis entre plantas y HMA es un proceso coordinado tanto por mecanismos fisiológicos, bioquímicos y de regulación génica (Fig. 1) (Bonfante y Desirò, 2015). El proceso de colonización de raíces comienza con la germinación de las esporas de HMA en el suelo, el micelio asimbiote explora el suelo hasta entrar en contacto con exudados de las raíces, los cuales contienen moléculas como las estrigolactonas que inducen la ramificación de las hifas y ejercen una quimiotaxis positiva hacia la raíz.

Los HMA por su lado liberan moléculas a base de quitina (lipo-quito-oligosacáridos y penta-quito-oligosacáridos) conocidos como "*factores Myc*". Estos, activan la simbiosis en las plantas mediante vías de señalización de genes denominados *SYM genes*, los cuales estimulan el desarrollo de las raíces laterales, la acumulación de almidón y desencadenan repetidas oscilaciones de calcio en las células de la rizodermis. Posteriormente, el contacto entre la hifa y la epidermis de la raíz induce la formación del hyphopodium (hifa de anclaje), la cual nuevamente mediante la señalización de *SYM genes* genera la agregación del citoplasma en las células de la rizodermis del sitio de contacto y las células corticales subyacentes.

La colonización de HMA dentro de la raíz comienza con la formación del aparato de pre-penetración (*PPA*, por su acrónimo en inglés), durante este paso las hifas del micelio intra-radical son separadas físicamente del citoplasma de las plantas por la invaginación de su membrana plasmática, logrando de esta manera mantener la integridad de la célula huésped. Una vez dentro de las células internas, las hifas ramifican en varias ocasiones hasta diferenciarse en arbusculos siendo estas la principal estructura en donde se da el intercambio de nutrientes, mientras que el micelio extra-radical de los HMA prolifera en el suelo más allá de la zona de agotamiento de nutrientes que rodea a las raíces. Este puente entre la solución del suelo y las raíces proporciona la base estructural para la mejora del

fitness ecológico de las plantas que son capaces de establecer una asociación de tipo micorrízica (Bonfante y Desirò, 2015).

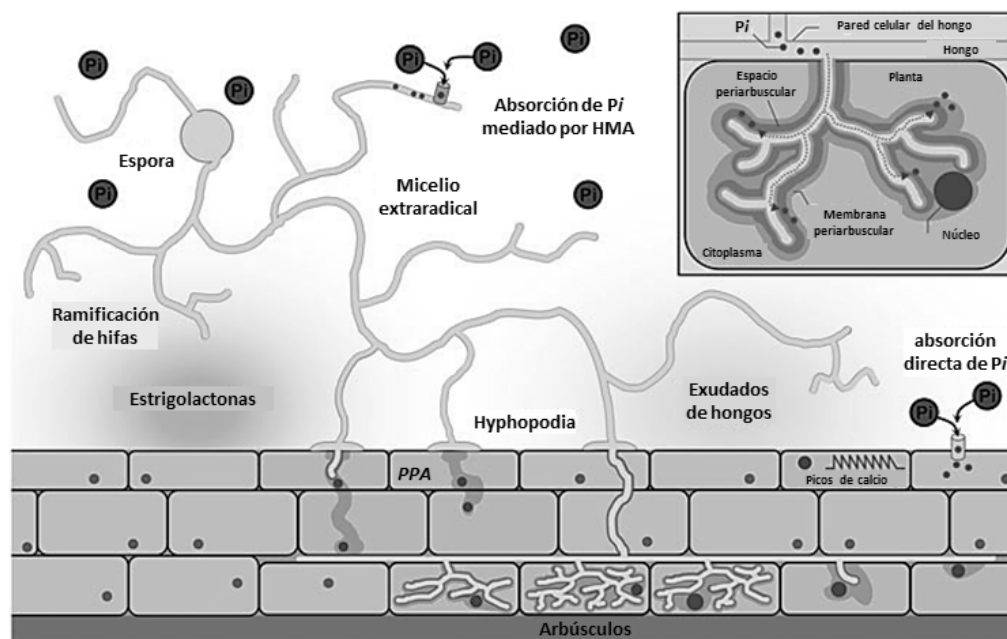


Figura 1. Diferentes pasos de la colonización de HMA en raíces y vías de absorción de fosfato (Bonfante y Desirò, 2015).

1.5. Vías y mecanismos de absorción del P_i

En plantas micotróficas existen dos vías de absorción de P_i desde la solución del suelo, ambas mediadas a través de proteínas transportadoras de alta afinidad ubicadas en la superficie de la membrana celular (Fig. 1). La primera es la vía de absorción directa (*DPU*, por su acrónimo en inglés) y se da a través de las células de la epidermis de la raíz y pelos radicales, la segunda es la vía de absorción a través de micorrizas (*MPU*, por su acrónimo en inglés) y es mediada por el micelio extra-radical de los HMA (Smith *et al.*, 2011; Smith y Smith, 2012). Cada vía de absorción involucra diferentes tipos de células, transportadores de P_i y el acceso a diferentes regiones y volúmenes del suelo (Smith *et al.*, 2011).

Tanto en plantas como en hongos la absorción de P_i se produce contra un gradiente de potencial electroquímico empinado debido a la carga negativa el P_i que es mantenido dentro de las membranas celulares (Fig. 2) (Smith y Smith, 2012; Karandashov y Bucher, 2005). Una bomba H^+ -ATP fosfohidrolasa (*ATPasa*,

por su abreviatura) que funciona a expensas de ATP, expulsa protones (H^+) generando un gradiente electroquímico y de concentración que facilita la absorción de P_i a través de transportadores de fosfato ubicados en la membrana plasmática.

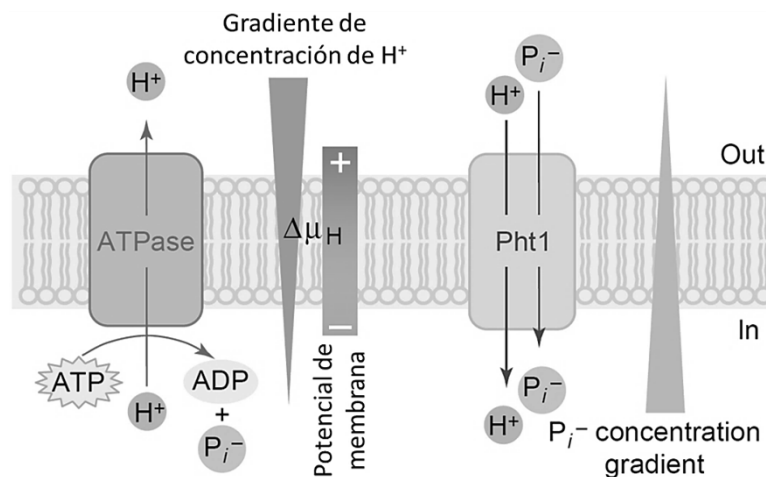


Figura 2. Mecanismo de transporte de fosfato a través de la membrana plasmática (Karandashov y Bucher, 2005).

De manera particular el P_i tomado por el micelio extra-radical de los HMA en la MPU es condensado en gránulos de polifosfato y transportado a lo largo de las hifas del micelio intra-radical hasta los arbusculos. Aquí el fosfato es liberado del hongo hacia el área de la interfaz simbiótica y transferido a su planta huésped mediante transportadores de fosfato inducidos por los HMA que se ubican en la membrana periarbuscular (Smith *et al.*, 2011; Bonfante y Desirò, 2015).

1.6. Genes *Pht1* y su implicación en el transporte de P_i en plantas

En la planta los genes que codifican a transportadores de fosfato se agrupan en tres familias, *Pht1*, *Pht2* y *Pht3*, cada familia contiene un grupo de proteínas que pueden tener funciones similares pero que son distintos entre sí, estos, son localizados en la membrana plasmática, la envoltura interna de los plastidios o son transportadores de fosfato mitocondriales (familias *Pht1*, 2 y 3, respectivamente) (Karandashov y Bucher, 2005). En plantas y hongos los transportadores *Pht1* regulan el transporte de P_i a través de la membrana plasmática, estos pertenecen a la familia de co-transportadores de fosfato-protones (H^+) y son englobados dentro de la superfamilia facilitadora principal de proteínas de membrana, los

cuales generalmente transportan una sola clase de compuestos (Rausch y Bucher, 2002; Karandashov y Bucher, 2005; Bucher *et al.*, 2007).

La predicción topología transmembranal de los transportadores *Ph1* se ilustra en la (Fig. 3a) (Karandashov y Bucher, 2005), estos contienen doce dominios que cruzan la membrana y están dispuestos en dos mitades (con terminales N- y C-) conectadas con un bucle hidrófilo, también se indican los posibles sitios de miristoilación, fosforilación y glicosilación, y la firma GGDYPLSATIxSE conservada en todos los transportadores *Ph1* de plantas. Por otro lado, en la (Fig. 3b) se indica el posible mecanismo co-transportador de fosfato- H^+ a través de un transportador de *Ph1*, este se divide en seis pasos: (1) la protonación de un transportador con un poro hidrofílico abierto hacia el exterior; (2) unión del anión fosfato; (3) el cambio conformacional que conduce a la apertura de los poros hacia el interior; (4) la liberación de fosfato; (5) desprotonación del transportador; y (6) regreso a la conformación original con la cara hacia el exterior.

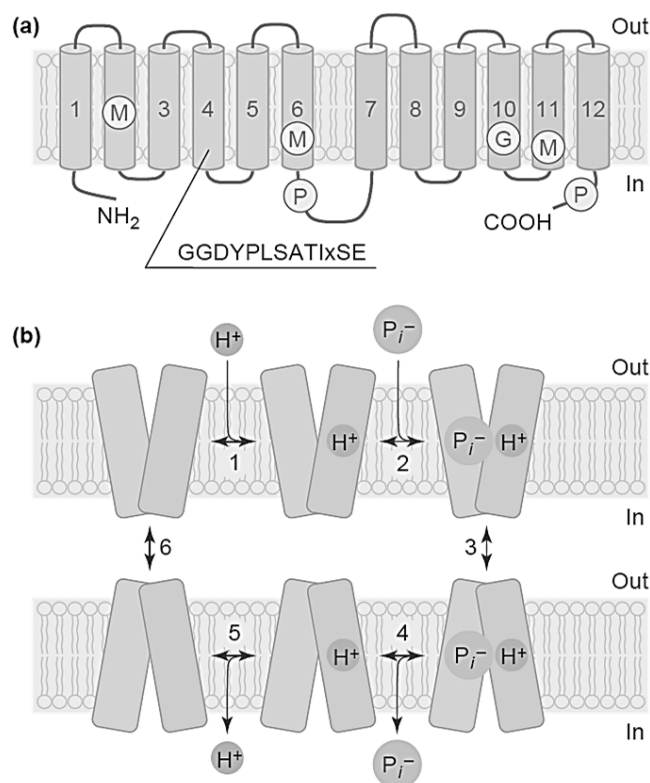


Figura 3. Predicción topología transmembranal de los transportadores *Ph1* (a) y posible mecanismo co-transportador de protón y fosfato a través de transportador de *Ph1* (b) (Karandashov y Bucher, 2005).

En planta los transportadores *Pht1* son expresados preferentemente en células del ápice de la raíz y pelos radicales (Smith *et al.*, 2011), y pueden estar expresados de manera constitutiva, estar bajo regulación por las concentraciones de fósforo en la solución del suelo o ser inducidos durante la colonización de HMA (Karandashov y Bucher, 2005; Tian *et al.*, 2013). Además, diferentes transportadores *Pht1* han demostrado participar en las dos vías de absorción en plantas (DPU y MPU) (Karandashov y Bucher, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1. Respuesta entre plantas y HMA

Según Feddermann *et al.* (2010) existen diferentes respuestas entre las combinaciones de especies de plantas y de HMA, la morfología, fisiología, estado nutricional de las plantas, la eficiencia simbiótica de HMA, así como la expresión de genes relacionados a la nutrición, son algunos de los parámetros que se ven modificados (Bucher, 2006; Smith *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012). Particularmente, las proteínas transportadoras de la familia *Pht1* ha mostrado participar en múltiples roles de adquisición y translocación de *Pi* durante diferentes condiciones de crecimiento y etapas de desarrollo en las plantas, así como durante la simbiosis con HMA (Loth-Pereda *et al.*, 2011).

En *Z. mays* L. han sido recientes los estudios dirigidos a investigar la respuesta del crecimiento vegetal, los cambios en la modificación fisiológica, las variables de respuestas microbiológicas y/o la expresión de genes *Pht1*, desplegada entre plantas asociadas a HMA y desarrolladas bajo diferentes concentraciones de *Pi* (Wright *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2014; Sangabriel-Conde *et al.*, 2014; Augé *et al.*, 2016). Sin embargo, mucho de los patrones de diversidad funcional entre cultivares aun no son del todo elucidados, principalmente aquellos relacionados con los cambios a nivel transcripcional de genes *Pht1* que son inducidos por HMA o por condiciones deficientes de P en los suelos, así como su posible efecto en el desarrollo morfo/fisiológico de sus plantas hospederas.

2.2. Expresión de genes *Pht1* inducidos por HMA

Diversos estudios han indicado la regulación en los niveles de transcripción de genes que codifican a transportadores *Pht1* en raíces de plantas colonizadas por HMA. Mediante análisis de árboles filogenéticos se ha observado ciertas predicciones sobre los posibles orígenes y relaciones entre diferentes grupos de transportadores, así como su posible función (por ejemplo: el alto grado de conservación entre los transportadores de fosfato inducidos por micorrizas *MtPT4*, *StPT4* y *ORYsa*; *Pht1*;11) (Fig. 4).

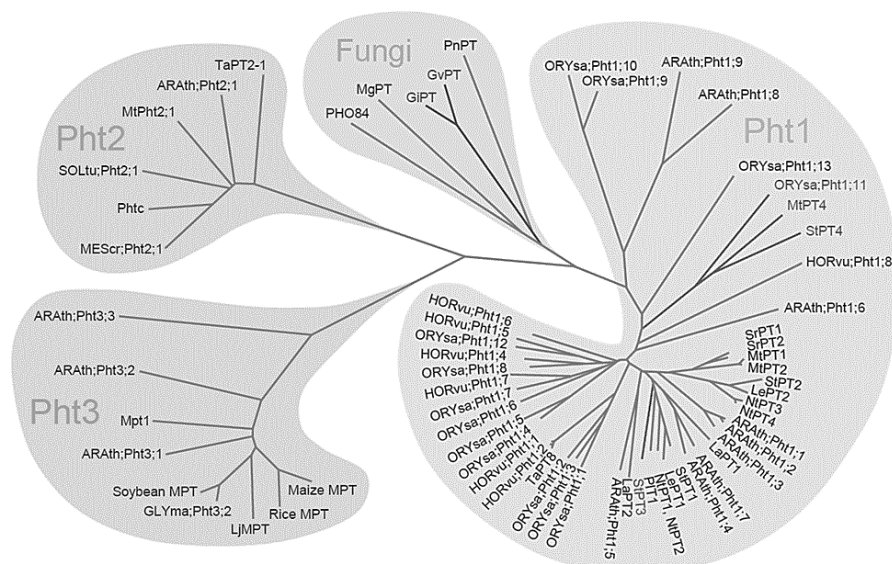


Figura 4. Árbol filogenético de varios transportadores de fosfato de plantas y hongos (Karandashov y Bucher, 2005).

Los primeros estudios realizados por Glassop *et al.* (2005) indicaron por pruebas de RT-PCR e hibridación *in-situ* un incremento en los niveles de expresión en raíces de los genes *HORvu;Pht1;8*; *TR1ae;Pht1;myc* y *ZEAm;Pht1;6* en plantas de *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum* y *Zea mays* respectivamente, durante la colonización de *Glomus intraradices*, *Glomus sp.* y *Scutellospora calospora*.

Por otro lado, los genes de *Lycopersicon esculentum* (*LePT4*) y *Solanum tuberosum* (*StPT4*) mostraron altos niveles de transcripción en raíces durante la colonización de *G. intraradices*, además, se demostró que su expresión fue exclusiva en células colonizadas por HMA, esto mediante la inserción del gen reportero GUS (*GUS: β-glucuronidasa*) en las regiones promotoras de ambos genes (Nagy *et al.*, 2005).

En *Lotus japonicus* técnicas de RT-qPCR mostraron una mayor expresión del transportador *LjPT3* en raíces colonizadas por *G. mosseae*, mientras que técnicas de localización *in situ* revelaron que los transcritos de *LjPT3* fueron expresados solamente en células del córtex interno de raíz que contenían arbusculos (Maeda *et al.*, 2006). También, células de raíces de papa transgénica que contenían arbusculos y bobinas de hifas, mostraron actividad GUS mediante la inserción del

promotor inducido por HMA del gen *PtPT10* de *Populus trichocarpa*, y mediante ensayos de inmunolocalización se demostró la acumulación de proteína *PtPT10* alrededor de las estructuras del micelio simbiótico desarrollado por *G. intraradices* (Loth-Pereda *et al.*, 2011).

En *Glycine max* L. un análisis de expresión de genes por RT-PCR mostró que los transportadores *GmPT7*, *GmPT10* y *GmPT11* fueron altamente inducidos en raíces durante la colonización de *G. intraradices*, además, la introducción de la proteína verde fluorescente (*GFP*) en los promotores *GmPT10* y *GmPT11*, y la subsecuente transformación de raíces, determinó de manera específica la expresión de estos genes sobre la membrana periarbuscular que envuelve las ramificaciones (Tamura *et al.*, 2012).

De manera reciente, se comprobó que los genes *SiPHT1;8* y *SiPHT1;9* de *Setaria italica* fueron inducidos en raíces durante la colonización de *Funneliformis mosseae*, esto mediante un análisis de RT-PCR (Ceasar *et al.*, 2014), mientras que en raíces de plantas de *Sorghum bicolor* y *Linum usitatissimum* se observó un cambio en la expresión de los transportadores *SOrbi;Pht1;9*, *SOrbi;Pht1;10* y *LINus;Phht:1;5*, *LINus;Phht:1;8*, respectivamente, los cuales fueron inducidos por la asociación de *Rhizophagus irregularis*¹ y *F. mosseae* (Walder *et al.*, 2015).

La expresión de los transportadores *Pht1* inducidos por HMA es generalmente mayor en las células de la raíz que contienen estructuras de estos hongos. De acuerdo con Javot *et al.* (2007) esto se atribuye principalmente a su participación directamente en la absorción *Pi* que es liberado por estos hongos en la interfaz simbiótica que mantienen con su planta huésped.

2.3. Genes *Pht1* en plantas de *Zea mays*

En *Z. mays* se han caracterizados seis genes miembros de la familia *Pht1* que codifican a transportadores de *Pi*, nombraron *ZEAm;Pht1;1* hasta *ZEAm;Pht1;6*.

¹ Hoy en día *Rhizoglyphus irregularis* (Błaszk., Wubet, Renker & Buscot) Sieverd., G.A. Silva & Oehl, Mycotaxon 129 (2): 381 (2015) [MB#803198] (Fuente: International Mycological Association (IMA) (2016)).

Entre las proteínas codificadas por estos genes se exhibe un alto grado de homología, siendo comparables en la longitud, peso molecular calculado, y el valor de punto isoeléctrico teórico (Tabla I) (Nagy *et al.*, 2006).

Tabla I. Genes de la familia *Pht1* en plantas de *Z. mays*.

Nombre del Gen	No. de Acceso a GenBank	aa ¹	kD ²	pI ³
<i>ZEAm;Pht1;1</i>	AY974041	541	58.8	7.6
<i>ZEAm;Pht1;2</i>	AY974042	542	58.8	7.6
<i>ZEAm;Pht1;3</i>	AY974043	547	58.3	7.6
<i>ZEAm;Pht1;4</i>	AY974044	539	58.4	7.1
<i>ZEAm;Pht1;5</i>	AY974045	509	56.1	8.8
<i>ZEAm;Pht1;6</i>	AY974046	554	60.6	8.2

Notas: ¹Se indica el número respectivo de aminoácidos (aa); ²la masa molecular calculada en kiloDaltons (kD); ³el valor de punto isoeléctrico teórico (pI).

De acuerdo con análisis de relaciones filogenéticas con otros transportadores y estudios de expresión génica, se ha indicado la presencia de diferentes grupos funcionales implicados en la absorción de P y su asignación a diferentes órganos (Nagy *et al.*, 2006), para esto último el gen *ZEAm;Pht1;6* ha sido asociado como un gen inducido por los HMA y el gen *ZEAm;Pht1;3* inducido en raíces por la baja deficiencias de fósforo en suelo. Diferentes estudios han indagado en los patrones de expresión del gen *ZEAm;Pht1;6* y el rol que desempeña en la nutrición de Pi en plantas de maíz. Estudios como los de Glassop *et al.*, (2005) lograron caracterizar por topología 3D al gen *ZEAm;Pht1;6*, además y mediante técnicas de hibridación *in situ* comprobaron que este gen fue inducido fuertemente en células del córtex que contenían estructuras de HMA. Por otro lado, técnicas de RT-PCR demostraron sobre el cultivar de maíz “Gold Queen” un incremento en el nivel de expresión de este gen en raíces cuando fue colonizada por *G. intraradices*, *Glomus* sp. y *S. calospora*.

Posteriormente, Nagy *et al.* (2006) lograron identificar a cinco nuevos genes de la familia *Pht1* en maíz (*ZEAm;Pht1;1*; *Pht1;2*; *Pht1;3*; *Pht1;4* y *Pht1;5*), siendo los transportadores *ZEAm;Pht1;1*, *Pht1;2* y *Pht1;4* asociados a la DPU al igual que el

gen *ZEAm;Pht1;3*, este último inducido en raíces de plantas que se encontraban en condiciones bajas de P y en polen, así mismo, la inoculación de *G. intraradices* genero altos niveles de transcripción en el gen *ZEAm;Pht1;6* en tejido de raíz, mientras que el gen *ZEAm;Pht1;5*, no pudo ser detectado en ningún tejido bajo las condiciones de evaluación que se establecieron.

3. JUSTIFICACIÓN

Dada la problemática de la baja disponibilidad de fósforo en los sistemas de producción agrícola y el agotamiento inminente de las reservas de roca fosfórica con el que son producido mayormente los fertilizantes fosfatados, es necesario el estudio de alternativas sustentables que optimicen el uso de este elemento en los suelos. En este sentido, el estudio y la implementación de una herramienta biotecnológica a base HMA toman relevancia debido al papel activo que tiene en el transporte de fósforo hacia su planta huésped. Por otro lado, es importante indagar en la diversidad funcional desplegada entre cultivares de maíz asociados con HMA y que se desarrollan bajo condiciones limitantes y altas de P_i , principalmente sobre los patrones de respuesta del crecimiento vegetal, la modificación fisiológica y la regulación en la expresión de genes *Ph1*. Los resultados de este trabajo contribuirán significativamente al desarrollo y establecimiento de prácticas de producción agrícola sostenibles que contemple el uso de estos microorganismos y la diversidad funcional desplegada entre los simbioses y los niveles de fósforo sobre los que se desarrollan.

4. HIPOTESIS

Si existen diferencias en la respuesta morfo/fisiología y expresión de genes *Ph1* entre especies de plantas, hongos micorrízicos arbusculares, y el ambiente en el que se desarrollan, entonces existirá una respuesta diferencial en al menos un cultivar de *Zea mays* L. asociado a estos hongos bajo dos concentraciones de P_i .

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la respuesta morfo/fisiológica y de expresión de genes *Pht1* de cuatro cultivares de *Zea mays* L. inoculados con hongos micorrízicos arbusculares bajo dos concentraciones de *Pi*.

5.2. Objetivos particulares

1. Determinar mediante variables microbiológicas el nivel de colonización de los HMA en las plantas hospederas.
2. Cuantificar parámetros de morfometría en cuatro cultivares de maíz asociados a HMA bajo dos concentraciones de *Pi*.
3. Cuantificar parámetros fisiológicos de cuatro cultivares de maíz asociados a HMA bajo dos concentraciones de *Pi*.
4. Determinar el nivel de expresión relativa de los transportadores de *Pi* *ZEAm;Pht1;3* y *ZEAmPht1;6* de cuatro cultivares de maíz asociados a HMA bajo dos concentraciones de *Pi*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Establecimiento del bioensayo

Área de estudio. Se estableció un bioensayo bajo condiciones de casa con malla anti-áfidos con 30 % de sombreo en el Campo Agrícola experimental “El Comitán”, perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), ubicado en el km 1 de la carretera a San Juan de la Costa a 24°08’32” de latitud norte y 110°18’39” de longitud oeste, a 0 msnm en La Paz, B.C.S (Fig. 5).

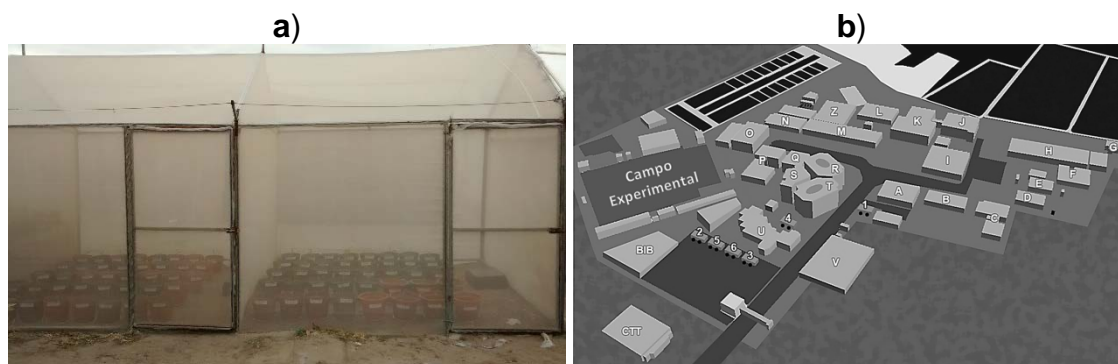


Figura 5. Casa sombra con malla anti-áfidos utilizada para el establecimiento del bio-ensayo (a); mapa de las instalaciones principales del CIBNOR (b) y la ubicación del campo agrícola experimental.

Material biológico. Se utilizaron semillas de cuatro cultivares de *Z. mays* L., tres de ellos fueron proporcionados por la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, campus Xalapa (FCA-UV-CX), con las siguientes claves y características; *PEE004-AC* (cultivar de grano medio y de color amarillo), *PEE004-BA2* (cultivar de grano grande y de color blanco) y *PEE004-RT* (cultivar de grano medio y de color rojo) (Fig. 6 a, b y c). Un cuarto cultivar se obtuvo en la zona “Las Positas” en el km 100, en el estado de la Baja California Sur, el cual se catalogó como *LPO-km100* (cultivar de grano pequeño y de color amarillo) (Fig. 6 d).

Se utilizó el inóculo de HMA “*CeUV-01*” que contenía la especie *Claroideoglomus etunicatum* (Fig. 7), donado por la M. en C. Liliana Lara Capistrán, investigadora

de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, *Campus* Xalapa. El inóculo contenía 11 esporas g^{-1} y un 68 % de colonización radical.

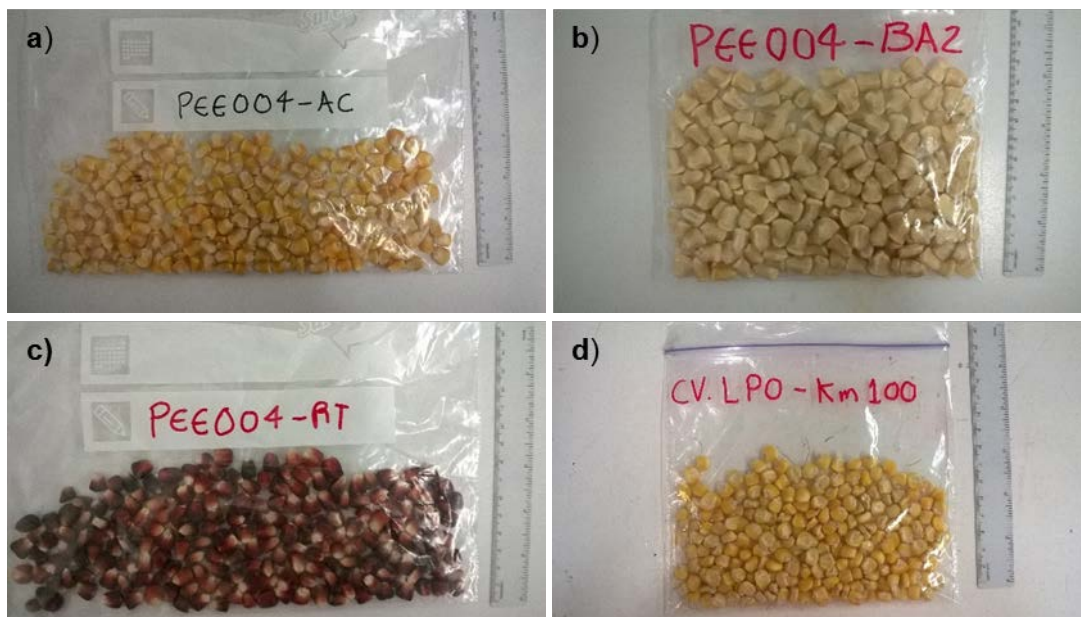


Figura 6. Diferencias de las semillas de los cultivares de maíz obtenidos para el establecimiento de este bioensayo. a) *PEE004-AC*; b) *PEE004-BA2*; c) *PEE004-RT* y d) *LPO-km100*.

Sustrato. Se utilizó una mezcla de arena de cuarzo previamente cernida a través de un tamiz con apertura de 2 mm, y musgo cosmopet (COSMCEL) en proporción 5:2 (v/v). El sustrato fue previamente esterilizado en autoclave (Sanyo, MLS-3751L) durante 15 min a 120 °C (14-15 lb/pulg² de presión de vapor) y aireado durante tres días. Se determinó el fósforo soluble con base a la metodología de Jackson (1976), en el Laboratorio de Servicios Analíticos de Edafología del CIBNOR, siendo 59 mg kg^{-1} de P presente en el sustrato.

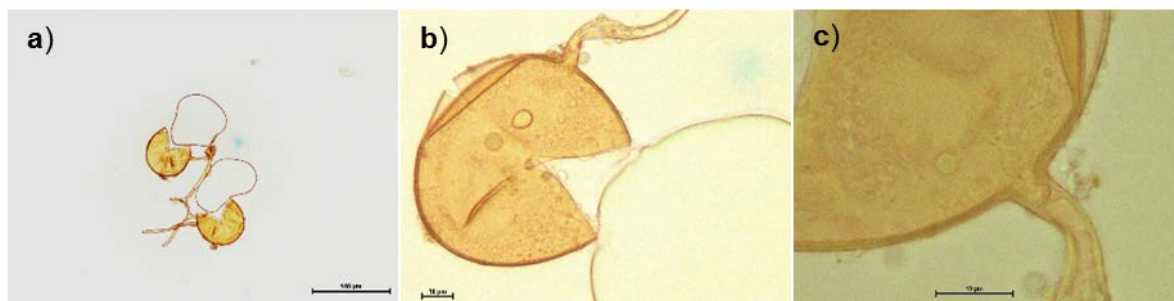


Figura 7. Esporas de HMA de *Claroideoglomus etunicatum* presente en el inóculo “CeUV-01”. La imagen a) esporas visualizada con objetivo 10X; b) espora

visualizada con objetivo 40X y c) espora visualizada con objetivo 100X, las barras de escala corresponden a 100 μm (a) y 10 μm (b y c).

Obtención de plántula y unidad experimental. Semillas de cada cultivar de maíz fueron esterilizadas en una solución de NaClO comercial al 20 % durante 20 min, se realizaron lavados con agua destilada estéril en tres tiempos durante 5 min antes de su siembra en almácigo con sustrato de la mezcla previamente descrita. Después de 10 días, plántulas individuales de cada cultivar que presentaban su segunda hoja verdadera fueron trasplantadas a macetas de 10 L previamente desinfectadas con una solución de NaClO al 10 %, y que contenía 7 L del sustrato previamente descrito.

Tratamientos e Inoculación. Un total de 16 tratamientos fueron establecidos, siendo estos el resultado de la combinación de los cuatro cultivares de maíz (PEE004-AC, PEE004-RT, PEE004-BA2 y LPO-km100) desarrollados en dos concentraciones de Pi (0.01 y 1 mM) y dos condiciones de HMA (con y sin). Durante el trasplante, cada tratamiento con HMA, fue inoculado con 7.5 g del inóculo de *C. etunicatum*.

Mantenimiento del experimento. Las plantas se mantuvieron en condiciones de casa sombra con malla anti-áfidos desde su siembra hasta su levantamiento 75 días después del trasplante (DDT). Se realizaron riegos cada tercer día con una solución nutritiva de *Hogland* con las siguientes modificaciones; KNO_3 (6 mM), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (4.0 mM), NH_4NO_3 (1.0 mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 mM), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.15 mM), $\text{Na}_2\text{EDTA}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.09 mM), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.009 mM), H_3BO_3 (0.046 mM), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0008 mM), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0005 mM), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.0005). K_2HPO_4 fue utilizado como fuente de fósforo, este se utilizó en las concentraciones 0.01 mM y 1 mM, siendo 0.309737 y 30.9737 mg L^{-1} (respectivamente) el contenido de P disponibles en la solución de riego.

6.2. Evaluación de variables morfo-métricas y fisiológicas

Variabes morfométricas. Se determinó a lo largo y al final del experimento la altura de planta en (cm) con un flexómetro de metal, partiendo de la base del tallo hasta

el ángulo superior del domo apical (meristemo apical) donde se forman los primordios foliares. El área foliar total expresada en cm^2 se obtuvo con un medidor Li-Cor, modelo Li- 3000A. La biomasa fresca y seca de tallos, hojas y sistema radical en g se determinó con una balanza electrónica (METTLER TOLEDO[®]), para secar los tejidos vegetales, estos se colocaron en bolsas de papel de estraza y mantuvieron a 60 °C en una estufa Shel-Lab, modelo FX-5 hasta peso constante.

Variables fisiológicas. La tasa neta de asimilación de CO_2 ($A = \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), conductancia estomática ($g_s = \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), tasa de transpiración ($E = \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y CO_2 intercelular ($C_i = \mu\text{molCO}_2\text{mol}^{-1}$) se midieron en campo sobre hojas jóvenes, sanas, turgentes, planas, del mismo tamaño y color, entre las 10:00 y 13 h en un día soleado y sin nubes. Para ello, se utilizó el analizador portátil LCi Photosynthesis System (de ADC BioScientificLtd[®]), acoplado a una cámara Broad que cubría una superficie de 6.25 cm^2 . El potencial hídrico foliar (PHF) en -Mpa, se verificó *ex situ* con un psicrómetro WP4-T (de DecagonDevices, Inc.) en un segmento de hoja joven, completamente desarrollada y que permaneció expuesto a luz directa durante 1 h. El índice de verdor se determinó *in situ* con un medidor portátil de doble longitud de onda (de Minolta[®] SPAD-502), la evaluación se realizó en base al promedio de tres puntos de lectura que se realizaron sobre la tercera hoja completamente desarrollada, sana, limpia y turgente, del mismo tamaño y color uniforme. El contenido de clorofilas a, b (mg cm^{-2}) y total (mg mL^{-1}), se determinó de acuerdo a la metodología de Ruiz-Espinoza *et al.* (2010).

6.3. Evaluación de variables microbiológicas

Extracción de esporas de HMA y tinción de raíces. Se realizó la extracción de esporas por el método de tamizado húmedo y gradiente de sacarosa en base a la metodología descrita por INVAM (2016a) con las siguientes modificaciones; una mezcla de 10 g de suelo y raíces fueron suspendidos en 1 L de H_2O destilada y agitados vigorosamente durante 5 min. En seguida la suspensión se filtró a través de tamices colocados de manera descendente, siendo recolectado el material depositado en el tamiz con la apertura de $65 \mu\text{m}$ en tubos de 50 mL, estos se

centrifugaron a 3200 xg por 5 min, transcurrido el tiempo se desechó el sobrenadante y, adicionándose 30 mL de sacarosa 2.5 M, nuevamente se centrifugó a 680 xg por 1 min, al finalizar, el sobrenadante se filtró a través de un papel filtro con ayuda de un embudo, y el exceso de sacarosa se lavó con agua destilada.

Por último, las esporas se colectaron con ayuda de una pipeta dentro un tubo 1.5 mL y se suspendieron en 50 μ L de H₂O destilada. La tinción de las raíces para la determinación del porcentaje de colonización se realizó con azul Trypan (azul de tripano) de acuerdo con la metodología descrita por el INVAM (2016b).

Numero de esporas y porcentaje de colonización. El número aproximado de esporas de HMA en el inóculo “*CeUV-01*” al inicio del experimento, así como para los diferentes tratamientos al final del bioensayo, se determinó mediante la técnica de conteos directos de baja densidad descrita por IVAM (2016c), con las siguientes modificaciones; se realizó el conteo total de las esporas presentes en 10 de los 50 mL totales de la suspensión de esporas extraídas de una mezcla de 10 g de suelo y raíces. Al finalizar el conteo, la media del número total esporas se multiplico por el factor de dilución (1:5), todos los conteos se realizaron sobre cajas de Petri de plástico con un diámetro de 4.5 cm, utilizando un microscopio estereoscópico (Nikon Eclipse E200) con el objetivo de 2X.

El porcentaje de colonización se estimó utilizando el método de intercesión magnificado de (McGonigle *et al.*, 1990). Para ello, 10 fragmentos aleatorios de raíz de ~1 cm, previamente teñidos con azul Trypan fueron montados sobre un portaobjetos de vidrio y tapados con un cubreobjetos. Se realizaron observación al microscopio con el objetivo de 10X, realizando 3 campos de visión a lo largo cada raíz (superior, centro e inferior). La estimación del total de observación se realizó en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de colonización} = \left(\frac{\text{Número de campos de visión con micorriza}}{\text{Número de observaciones}} \right) \times 100 \quad (1)$$

6.4. Análisis de la expresión relativa de genes *Pht1* en raíces de *Zea mays*

Al final del bioensayo se tomó una muestra de raíces de cada unidad experimental para cada uno de los tratamientos sometido a evaluación, para ello, se recolectaron 5 g de raíces (aproximadamente) de la parte basal del centro de la raíz, se lavaron con agua destilada, envolvieron en papel aluminio y almacenaron en nitrógeno líquido, para su traslado al laboratorio en donde se almacenaron en un ultra congelador a -80 °C durante 3 meses hasta su procesamiento.

Se realizó la extracción del ARN total de 250 mg de tejido de raíz utilizando el método de TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones de la ficha técnica del fabricante (Life Technologies, 2012). Para eliminar el residuo de ADN genómico se realizó la purificación de ARN mediante un tratamiento con la enzima DNase I (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las especificaciones de la ficha técnica del fabricante (Invitrogen, 2002).

La integridad del ARN se avaluó visualmente en geles de electroforesis de agar al 2 %, utilizando como agente desnaturalizantes cloro comercial (CLORALEX) al 1 %, con base a la metodología descrita por Aranda *et al.* (2012). La concentración del ARN total en ng μL^{-1} se realizó por espectrofotometría en el rango de los 260/230 nanómetros (nm) en un equipo NanoDrop (ThermoScientific). Aproximadamente 100 ng del RNA total se utilizaron como molde para la síntesis de cDNA el cual se realizó a partir de la enzima de transcriptasa reversa SuperScript® II (Thermo Fisher Scientific) con base a las especificaciones de la ficha técnica del fabricante (Promega, 2012). Al final el cDNA se almaceno a -20 °C hasta su uso.

Para los ensayos de expresión de genes en tiempo real (RT-*q*PCR), se utilizó el reactivo SsoFast™EvaGreen®SuperMix (Bio-Rad), con base a la ficha técnica del fabricante (Bio-Rad Laboratories, 2016). Cada reacción de RT-*q*PCR contenía 5 μL de SsoFast™EvaGreen®SuperMix [2X]; 0.3 μL de cada cebador Forward y Reverser [10 μm] y 1.5 μL cDNA [1:0]. El volumen final de la reacción fue ajustado a 10 μL con H₂O miliQ ultra pura, previamente esterilizada y filtrada.

Las condiciones de amplificación fueron de un ciclo a 95 °C por 30 s para la activación de la enzima, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 5 s para la desnaturalización y 60 °C por 30 s para alineamiento y extensión. Para la generación de la curva de disociación se realizó un ciclo de 65 a 95 °C con incrementos de 0.5 °C cada 5 s. Todo esto se realizó en un termociclador de tiempo real “C1000Touch™” (Bio-Rad CFX96™ Real-Time System).

Se utilizaron los cebadores para la genes *ZEAmA:Pht1;3*, y *ZEAmA:Pht1;6*, sugeridos por Deng *et al.* (2014), mientras que para normalizar los niveles de expresión se evaluaron los cebadores para los genes endógenos *γ-tubulin*, *ZmUBQ2*, y el factor de iniciación eucariota 4A (*EIF4A*) (Bustin *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014) (Tabla II). Se utilizó aquellos pares de cebadores que mostraron una eficiencia comparable en la reacción de RT-*q*PCR.

Tabla II. Lista de cebadores para los genes *Pht1* y de genes constitutivos utilizados en el ensayo de RT-*q*PCR¹.

Nombre del Gen	Primer en sentido 5'-3'	Primer anti-sentido 5'-3'	Tamaño (pb)
<i>ZEAmA:Pht1;3</i>	tgttccgttctgtctggtgctgtg	tcccgacggtgacctccgattatta	180
<i>ZEAmA:Pht1;6</i>	cggacgtgagcaaggatgacaa	ggattccacaccccctgtgtagt	180
<i>ZmUBQ2</i>	ggattccacaccccctgtgtagt	atggacgcacgctggctgacta	220
<i>γ-tubulin</i>	gtcctgtgccactctattgc	ctgtttccacctgattgg	130
<i>EIF4A</i>	cgccagaggttctacaa	catcctcgccacaatac	180

Nota: ¹se indica la secuencia de los primer's y el tamaño del producto en pares de bases (pb).

La eficiencia de la amplificación de la PCR se estableció mediante curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de 1:0, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 del molde de cDNA (Bustin *et al.*, 2009). La eficiencia de amplificación se determinó a partir de la pendiente de la porción Logarítmica-lineal de la curva de calibración, esto cuando el logaritmo de la concentración inicial del molde (variable independiente) se graficó en el eje X y el *C_q* (variable dependiente) se grafica en el eje Y. El cálculo se realizó con base a la siguiente formula;

$$\text{Porcentaje de la eficiencia de PCR} = 10^{-1/\text{pendiente}} \times 100 \quad (2)$$

El máximo teórico es 1.00, indicando que la cantidad de producto de la reacción se duplica con cada ciclo. Para el análisis de expresión relativa de los genes objetivo se recurrió al método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livack y Schmittgen, 2001). Para ello se utilizó la siguiente formula;

$$\text{Cambio en el nivel de expresion} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad (3)$$

Donde:

$$\Delta\Delta Cq = (Cq_{objetivo} - Cq_{endogeno})_{calibrador} - (Cq_{objetivo} - Cq_{endogeno})_{tratamiento} \quad (4)$$

Los resultados son expresados como el cambio en el nivel de expresión en unidades de un gen objetivo en un grupo de tratamientos con relación a un grupo control.

6.5. Diseño experimental y Análisis Estadístico

Se estableció un diseño experimental de tipo trifactorial y de interacciones entre niveles. Los factores en estudio fueron:

- **Factor A)** concentración de Pi en dos niveles denominados; 0.01 mM y 1 mM.
- **Factor B)** condición de HMA en dos niveles denominados; sin HMA y con HMA.
- **Factor C)** cultivar de maíz en cuatro niveles denominados; CV.1, CV.2, CV.3 y CV.4 (cultivares *PEE004-AC*, *PEE004-BA2*, *PEE004-RT* y *LPO-km100*, respectivamente)

Para el análisis de interacción, los *valores-P* menores a 0.05 probaron un efecto estadístico entre los factores con un nivel de confianza del 95 %. Por otro lado, se evaluaron 16 tratamientos resultado de la combinación de los niveles de cada factor mediante un análisis unifactorial.

Para establecer diferencias significativas entre los niveles de los factores, las interacciones y entre tratamientos, se recurrió a un análisis de comparación de

medias múltiple utilizando el método de diferencias honestamente significativas (HSD, por su acrónimo en inglés) de Tukey con una confianza de 95 %.

Se realizó un análisis de correlación por rangos de Spearman. El rango de estos coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la asociación entre las variables. Valores-*P* menores de 0.05 indicaron un correlacion significativa diferente de cero, con un nivel de confianza del 95 %. Todos los análisis se realizaron en el software STATGRAPHICS Centurión XV (StatPoint, Inc. 1982-2007).

7. RESULTADOS

7.1. Respuesta del crecimiento vegetal

7.1.1. Respuesta del crecimiento vegetal entre factores

En la Tabla III se agrupan los resultados del análisis trifactorial y de interacción, para las diferentes variables de respuesta al crecimiento vegetal de plantas de maíz a los 75 DDT. Entre los niveles de los factores A (concentración de P_i); B (condición de HMA); y C (cultivar de maíz), las variables de área de hojas (cm^2), longitud de raíz (cm) y peso seco de hojas (g), mostraron diferencias estadísticas. Específicamente el área de hojas incremento significativamente en plantas que crecieron bajo la concentración 1 mM v/s 0.01 mM de P_i (6509.78 v/s 6052.5 cm^2), y en plantas asociadas a HMA v/s sin HMA (6551.38 v/s 6010.91 cm^2) (Fig. 8), mientras que entre cultivares, el CV.4 (5350.73 cm^2) genero el menor efecto estadístico (Fig. 9).

Por otro lado, la longitud de raíz incremento significativamente en plantas que crecieron bajo la concentración 1 mM v/s 0.01 mM de P_i (38.07 v/s 32.48 cm), y en plantas sin la presencia de HMA v/s con HMA (37.1325 v/s 33.42 cm) (Figs. 9 y 10, respectivamente), mientras que entre cultivares, las medias de los Cv. 1 y 2 mostraron diferencias estadísticas entren si con 32.4 y 39.215 cm (respectivamente) (Fig. 10). Para el peso seco de hojas, se observó un incremento significativo en plantas que crecieron bajo la concentración 1 mM vs 0.01 mM de P_i (35.29 v/s 33.03 g), y en plantas asociadas a HMA v/s sin HMA (35.23 v/s 33.08 g) (Fig. 11), mientras que entre cultivares, la media del CV. 4 (30.01 g) genero el menor efecto estadístico (Fig. 12).

Entre los niveles del factor C, las variables de peso seco de tallos, hojas y biomasa aérea (g) mantuvieron diferencias estadísticas entre cultivares. Para la variable de peso seco de tallos las medias de los cultivares 3 y 4 (52.015 y 51.395 g, respectivamente) fueron significativamente inferiores a la del cultivar 2 (64.595 g), mientras que en la variable de peso seco de raíz la media del cultivar 4 (26.395 g) presento el menor efecto estadístico entre los demás cultivares (Fig. 13). Para

la variable de biomasa seca aérea se observó que la media del cultivar 2 (99.33 g) incremento estadísticamente con relación a la media del cultivar 3 (87.335 g) (Fig. 14).

Entre los niveles de los factores A y C, la variable de biomasa seca total (g) mostro diferencias estadísticas donde, plantas que crecieron bajo la concentración 1 mM v/s 0.01 mM de P_i incrementaron estadísticamente esta variable con 132.30 v/s 123.57 g (respectivamente), mientras que entre cultivares, la media del CV. 4 (107.80 g) genero el menor efecto estadístico (Fig. 15). Finalmente, para la variable de altura de plantas (cm) no se observó diferencias estadísticas entre los niveles de los tres factores sometidos evaluaciones durante este bioensayo.

7.1.2. Respuesta de crecimiento vegetal por la interacción entre factores

La interacción de los factores A*C genero un efecto significativo sobre la variable de peso seco de raíz (g). Particularmente plantas del cultivar 3 que se desarrollaron bajo la concentración 1 mM v/s 0.01 mM de P_i incrementaron significativamente esta variable con 49.24 v/s 33.36 g (respectivamente) (Fig. 16). Por otro lado, la interacción de los factores B*C generó un efecto significativo sobre las variables de longitud de raíz (cm), peso seco de hojas (g) y biomasa seca total (g). Para la variable de longitud de raíz se observó un incremento significativo en plantas del cultivar 3 que se desarrollaron sin la presencia de HMA v/s con HMA (39.8 y 30.8 g), respectivamente (Fig. 15). Para el peso seco de hojas se observó incremento significativamente en plantas de los cultivares 3 y 4 que se desarrollaron con la presencia de HMA v/s sin HMA (38.01 v/s 32.63 y 32.07 v/s 27.96 g), respectivamente. Finalmente, la biomasa seca total incremento significativamente en plantas del cultivar 3 que se desarrollaron con la presencia de HMA v/s sin HMA (139.92 y 117.35 g) respectivamente (Fig. 16).

Tabla III. Análisis factorial del crecimiento vegetal de plantas de maíz a los 75 DDT¹.

	Altura de planta (cm)	Área de hojas (cm ²)	Longitud de raíz (cm)	Peso seco				
				Tallos (g)	Hojas (g)	Raíz (g)	Biomasa aérea (g)	Biomasa total (g)
Factor A: Concentración de Pi								
Pi [0.01 mM)	152.235 ^a	6052.5 ^b	32.4875 ^b	55.1625 ^a	33.03 ^b	35.3875 ^a	90.4825 ^a	123.578 ^b
Pi [1 mM)	138.45 ^a	6509.78 ^a	38.07 ^a	58.945 ^a	35.292 ^a	38.07 ^a	96.4875 ^a	132.308 ^a
Factor B: Condición de HMA								
Con HMA	139.59 ^a	6551.38 ^a	33.425 ^b	57.52 ^a	35.2375 ^a	37.9225 ^a	94.8525 ^a	130.68 ^a
Sin HMA	151.095 ^a	6010.91 ^b	37.1325 ^a	56.5875 ^a	33.085 ^b	35.535 ^a	92.1175 ^a	125.205 ^a
Factor C: Cultivar de maíz								
CV.1	147.15 ^a	6574.26 ^a	32.4 ^b	60.21 ^{ab}	36.575 ^a	40.975 ^a	96.785 ^{ab}	137.76 ^a
CV.2	149.545 ^a	6624.56 ^a	39.215 ^a	64.595 ^a	34.735 ^a	38.245 ^a	99.33 ^a	137.57 ^a
CV.3	131.04 ^a	6575.03 ^a	35.3 ^{ab}	52.015 ^b	35.32 ^a	41.3 ^a	87.335 ^b	128.635 ^a
CV.4	153.635 ^a	5350.73 ^b	34.2 ^{ab}	51.395 ^b	30.015 ^b	26.395 ^b	90.49 ^{ab}	107.805 ^b
Interacción A*B								
Razón-F	0.09	0.94	0.14	0.06	1.76	0.89	0.53	0.06
Valor de P	0.7611	0.3364	0.7060	0.8119	0.1891	0.3491	0.4687	0.8074
Interacción A*C								
Razón-F	0.21	1.12	1.91	0.51	1.65	3.07	0.30	1.66
Valor de P	0.8918	0.3480	0.1370	0.6798	0.1868	0.0339*	0.8226	0.1834
Interacción B*C								
Razón-F	0.43	1.47	2.57	0.48	4.08	1.70	1.08	2.72
Valor de P	0.7323	0.2314	0.0619**	0.6971	0.0103*	0.1755	0.3629	0.0518*
Interacción A*B*C								
Razón-F	0.16	0.50	0.34	1.19	1.40	0.43	0.90	1.41
Valor de P	0.9240	0.6868	0.7971	0.3218	0.2506	0.7355	0.4466	0.2471

Notas: Análisis trifactorial y de interacciones. A) concentraciones de Pi (dos niveles); B) condiciones de HMA (dos niveles) y C) cultivar de maíz (cuatro niveles). Cada valor corresponde a la media n= 40 (factores A y B), n=20 (factor C). Las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$; La Agrupación de la información se realizó utilizando el método de (HSD) de Tukey con una confianza del 95 %. Para las interacciones los valores-P menores a 0.05 (*) o 0.1 (**) prueban un efecto estadístico entre los factores. ¹ Días Después del Trasplante.

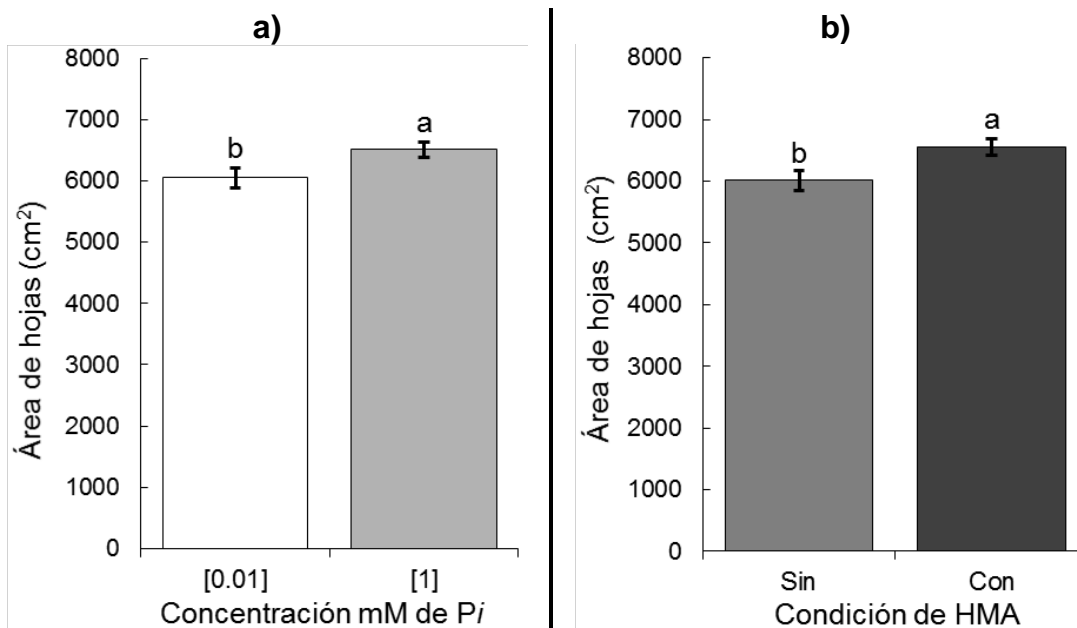


Figura 8. Área de hojas (cm²) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de Pi y b) condición de HMA. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

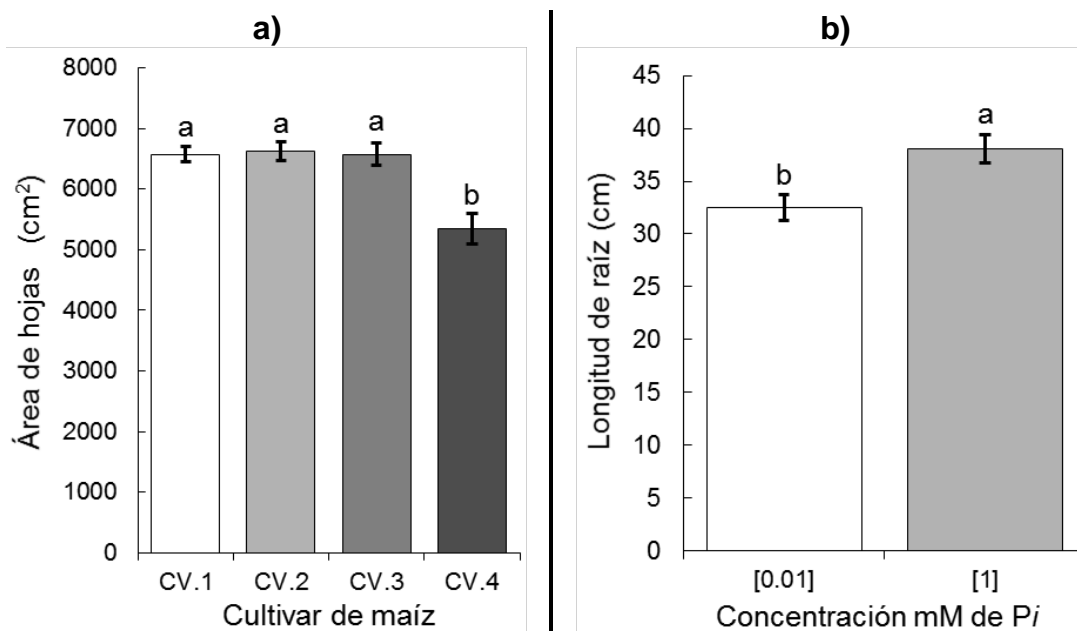


Figura 9. Área de hojas (cm²) y longitud de raíz (cm) a los 75 DDT para los factores: a) cultivar de maíz y b) concentración de Pi. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

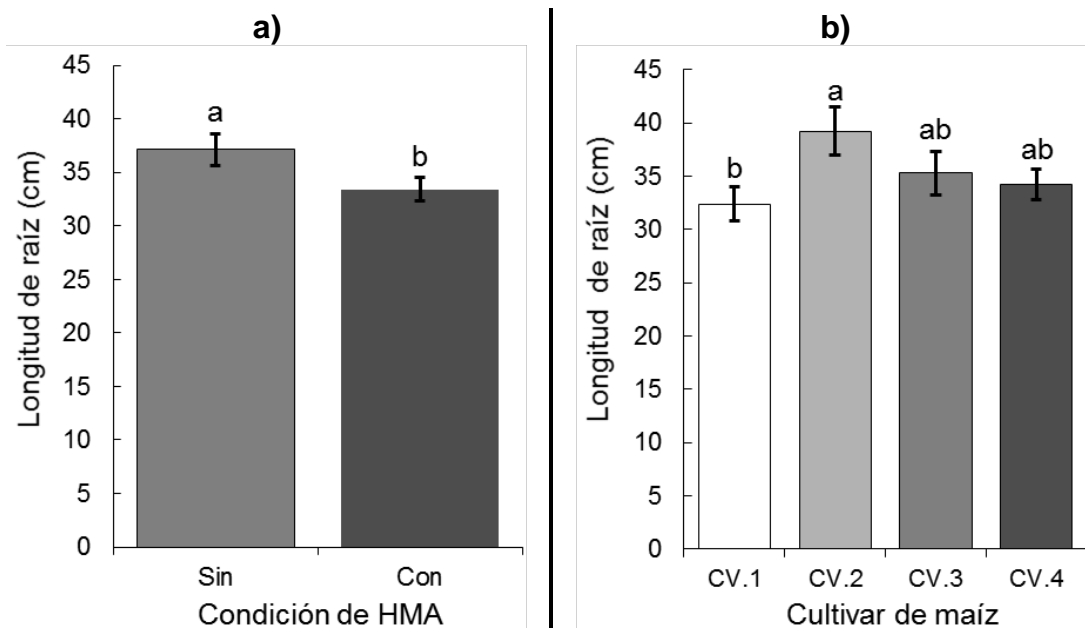


Figura 10. Longitud de raíces (cm) a los 75 DDT para los factores: a) condición de HMA y b) cultivar de maíz. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

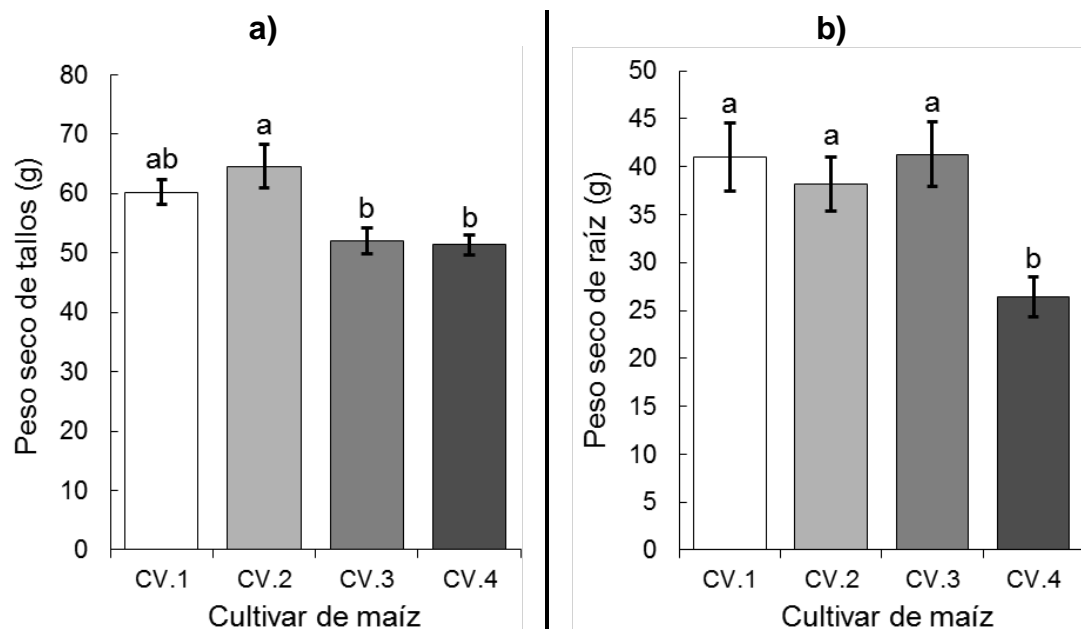


Figura 11. Peso seco de tallos (a) y peso seco de raíz (b) a los 75 DDT para el factor cultivar de maíz. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

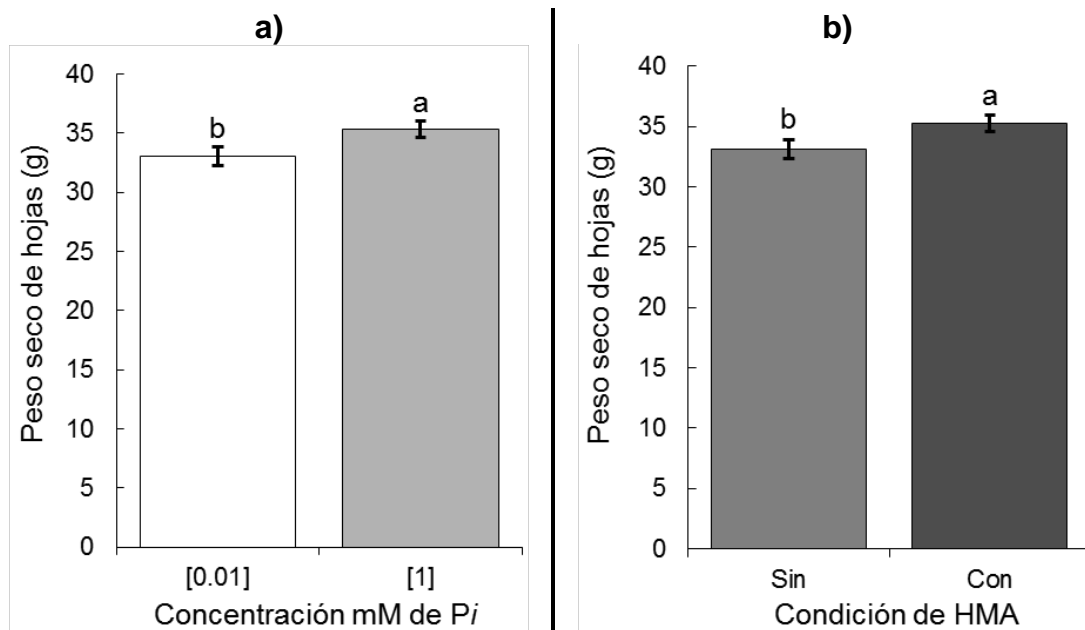


Figura 12. Peso seco de hojas (g) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de Pi, y b) condición de HMA. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

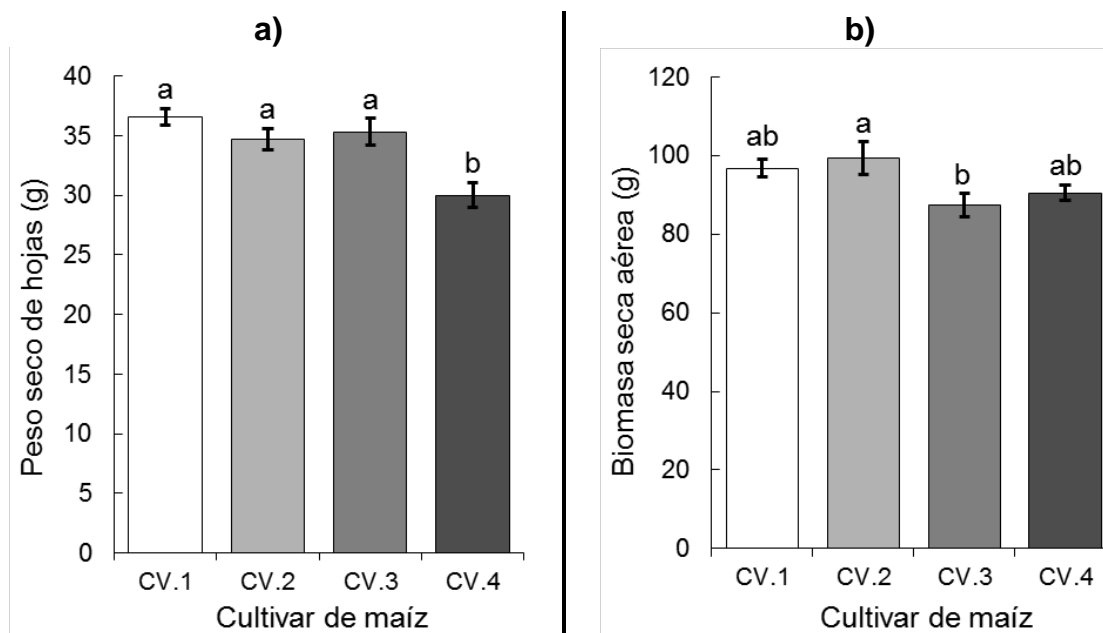


Figura 13. Peso seco de hojas (a) y biomasa seca aérea (b) a los 75 DDT para el factor cultivar de maíz. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

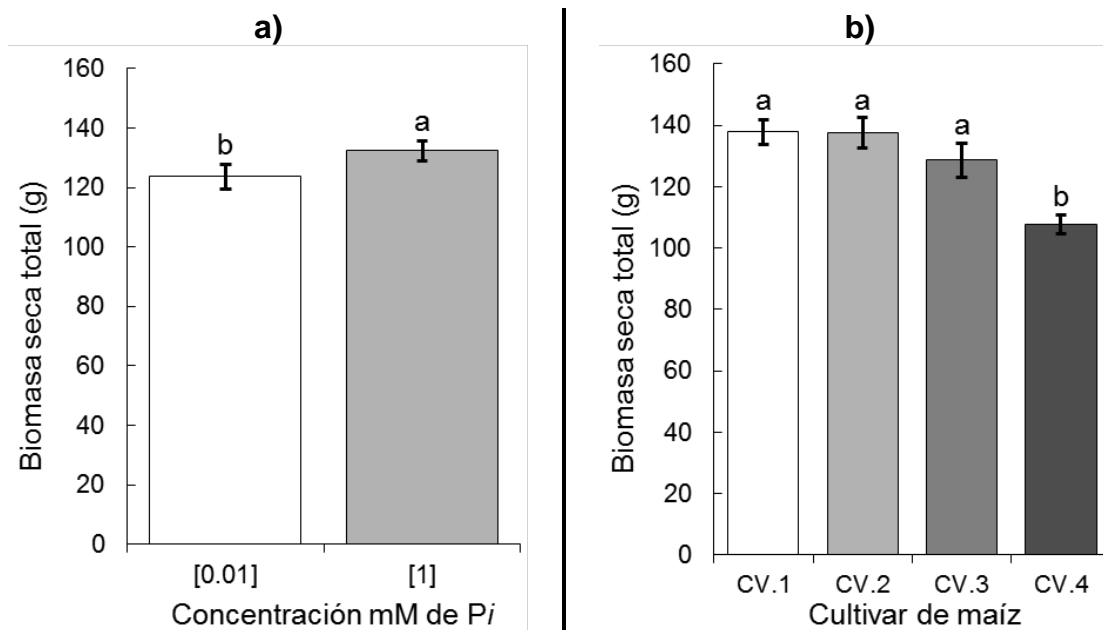


Figura 14. Biomasa seca total (g) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de Pi y b) cultivar de maíz. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

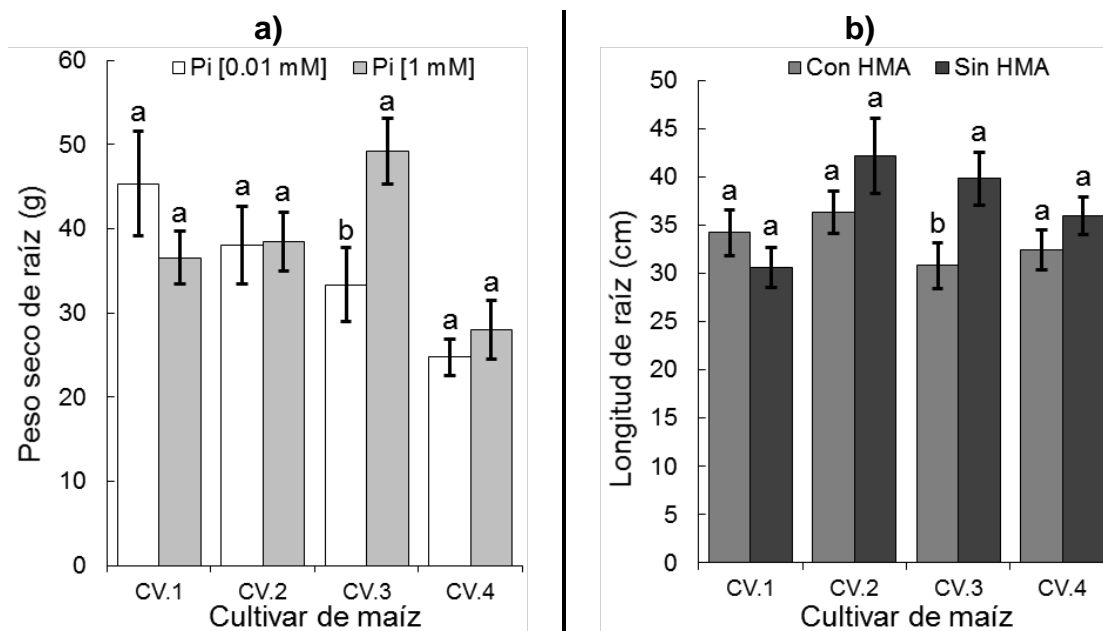


Figura 15. Peso seco de raíz (g) entre la interacción de los factores A*C (a); Longitud de raíz (cm) entre la interacción de los factores B*C (b). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

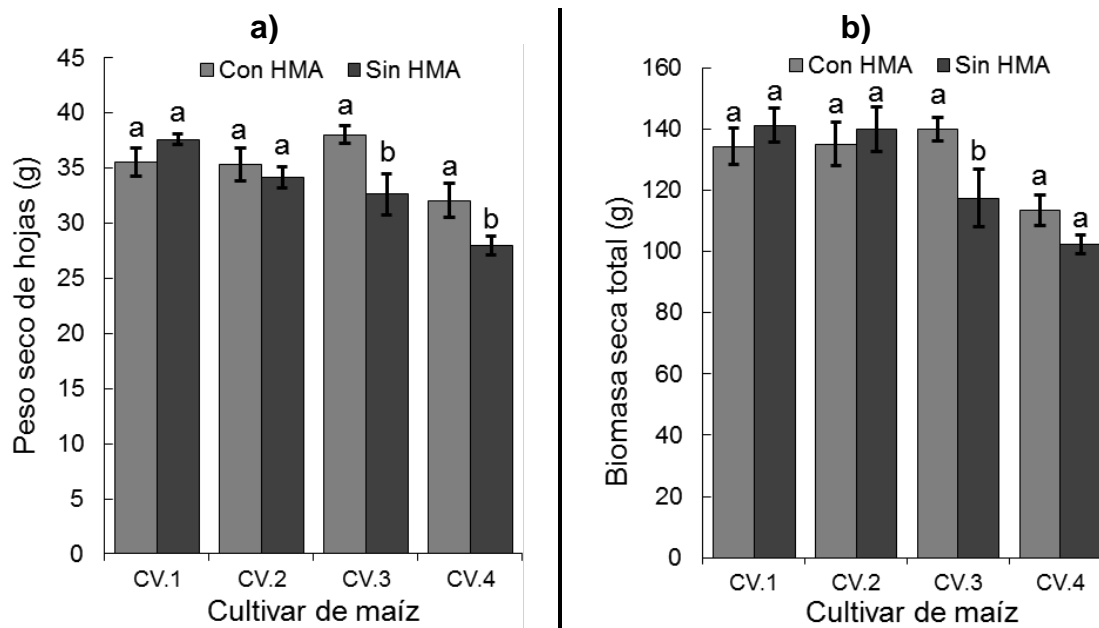


Figura 16. Peso seco de hojas (a) y biomasa seca total (b) entre las interacciones de los factores B*C. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

7.1.3. Respuesta del crecimiento vegetal entre tratamientos

En la (Tabla IV), se agrupan los resultados del análisis de varianza entre tratamientos para las diferentes variables de respuesta al crecimiento vegetal de plantas de maíz a los 75 DDT. Un total de 16 tratamientos fueron analizados como resultado de la combinación de los cuatro cultivares de maíz, las dos concentraciones de *Pi* (1 y 0.01 mM) y las dos condiciones de HMA (con y sin). En la (Fig. 17) se muestra parte de las plantas de maíz a los 75 DDT correspondientes a los 16 tratamientos sometidos a evaluación.

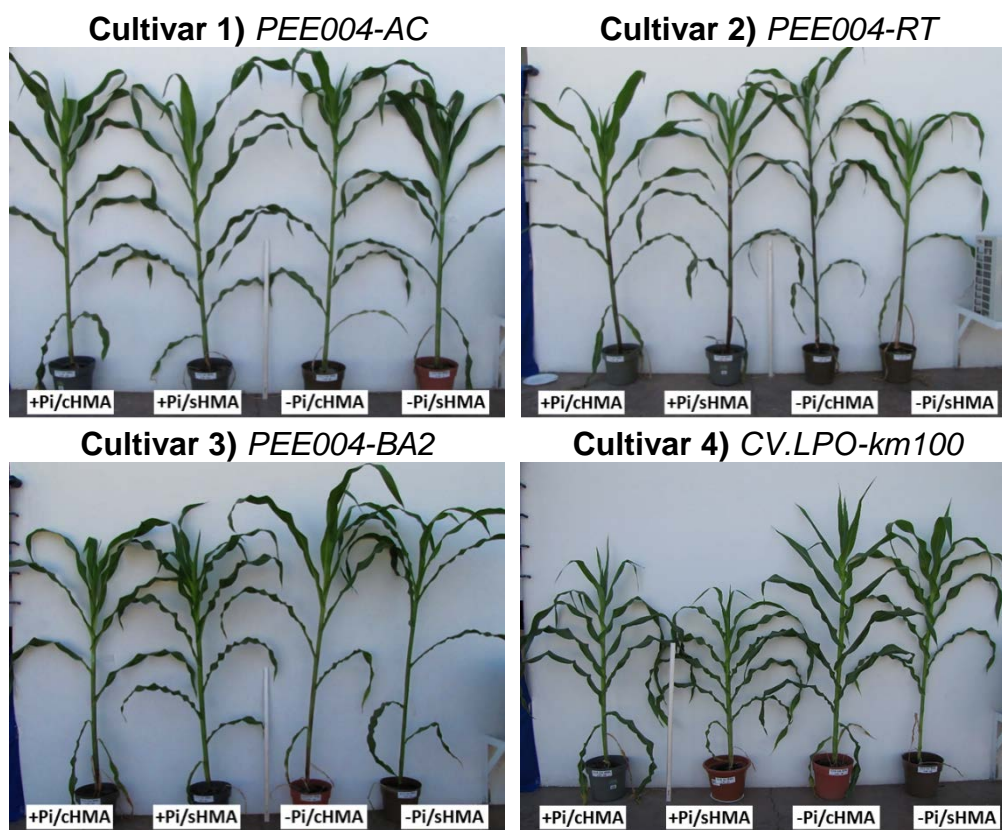


Figura 17. Respuesta de crecimiento de plantas de maíz a los 75 DDT. Se evaluaron dos concentraciones de *Pi* (1 y 0.01 mM) y dos condiciones de HMA (con y sin).

Para la variable de área de hojas (cm^2) se observaron diferencias estadísticas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 3 y 4, para ambos casos la mayor variación estadística se generó por la combinación de los factores concentración de *Pi* y condición de HMA. Para el cultivar 3, el tratamiento CV.3/*Pi* [1mM]/Con HMA (7139.28 cm^2) generó un incremento significativo con relación al

tratamiento CV.3/*Pi* [0.01mM]/Sin HMA (5229.46 cm²). Mientras que el tratamiento CV.4/*Pi* [1 mM]/Con HMA (6381.06 cm²) del cultivar 4, genero un incremento significativo con relación al tratamiento CV.4/*Pi* [0.01mM]/Sin HMA (4415.86 cm²) (Fig. 18).

Para la variable de longitud de raíz (cm) se observaron diferencias significativas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 1 y 4. Para el cultivar 1 la mayor variación estadística entre tratamientos se generó por la concentración de *Pi*, donde planta que crecieron en la concentración 1 mM v/s 0.01 mM de *Pi*, mantuvieron un incremento estadístico. Para el cultivar 4 la mayor variación estadística se generó por la combinación de los factores concentración de *Pi* y condición de HMA, donde el tratamiento CV.4/*Pi* [1mM]/Sin HMA (40.6 cm) mantuvo un incremento estadístico con relación a los tratamientos CV.4/*Pi* [0.01mM]/Sin y Con HMA (31.4 y 29.4 cm) respectivamente (Fig. 19).

Para la variable de peso seco de tallos (g) se observaron diferencias significativas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 1. Para este cultivar la mayor variación estadística se generó por la combinación de los factores concentraciones de *Pi* y condición de HMA, donde el tratamiento CV.1/*Pi* [1mM]/Con HMA (66.14 g) mantuvo un incremento significativo con relación al tratamiento CV.1/*Pi* [0.01mM]/Con HMA (53.48 g) (Fig. 20).

Para la variable de peso seco de hojas (g) se observaron diferencias significativas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 1, 3 y 4, particularmente estas variaciones se puntualizaron entre la condición de HMA. Para el cultivar 1 plantas del tratamiento CV.1/*Pi* [1mM]/Sin HMA (38.72 g) mantuvieron un incremento estadístico con relación al tratamiento CV.1/*Pi* [1mM]/Con HMA (34.34 g). Para el cultivar 3, plantas del tratamiento CV.3/*Pi* [0.01mM]/Sin HMA (28.94 g) presentaron el menor efecto estadístico dentro el conjunto de tratamiento de este cultivar, mientras que para el cultivar 4, el tratamiento CV.4/*Pi* [1mM]/Con HMA (34.52 g) mantuvo el mayor incremento entre la combinación de tratamientos del cultivar 4 (Fig. 21).

Para la variable de peso seco de raíz (g) se observaron diferencias significativas entre la combinación de tratamientos del cultivares 3. Para este cultivar la mayor variación estadística se generó por la combinación de los factores concentración de *Pi* y condición de HMA, donde, el tratamiento CV.3/*Pi* [1mM]/Con HMA (53.94 g) mantuvo un incremento estadístico con relación al tratamiento CV.3/*Pi* [0.01mM]/Sin HMA (26.6 g) (Fig. 22).

Para la variable de biomasa seca área (g) solamente se observaron diferencias significativas entre la combinación de tratamientos del cultivares 3, donde el tratamiento CV.3/*Pi* [0.01mM]/Sin HMA (74 g) genero el menor efecto estadístico de entre el grupo de tratamientos (Fig. 23). Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 3 y 4, para la variable de biomasa seca total (g). Para ambos casos, estas variaciones se puntualizaron entre la combinación de factores concentración de *Pi* y condición de HMA, donde para el cultivar 3 el tratamiento CV.3/*Pi* [0.01mM]/Sin HMA (100.6 g) presentó el menor efecto estadístico de entre todos, mientras que el tratamiento CV.4/*Pi* [1mM]/Con HMA (123.96 g) presento el mayor efecto estadístico dentro la combinación de tratamientos del cultivar 4 (Fig. 24).

Tabla IV. Respuesta entre tratamiento del crecimiento vegetal de plantas de maíz a los 75 DDT.

Tratamientos			Altura de planta (cm)	Área de hojas (cm ²)	Longitud de raíz (cm)	Peso seco				
						Tallos (g)	Hojas (g)	Raíz (g)	Biomasa aérea (g)	Biomasa total (g)
CV.1	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	159.98 ^a	6328.12 ^a	25.0 ^b	58.12 ^{ab}	36.48 ^{ab}	50.2 ^a	94.6 ^a	144.8 ^a
		Con HMA	140.38 ^a	6761.24 ^a	29.6 ^b	53.48 ^b	36.76 ^{ab}	40.56 ^a	90.24 ^a	130.8 ^a
	Pi [1 mM]	Sin HMA	144.34 ^a	6585.28 ^a	36.2 ^a	63.1 ^{ab}	38.72 ^a	35.92 ^a	101.82 ^a	137.74 ^a
		Con HMA	143.9 ^a	6622.38 ^a	38.8 ^a	66.14 ^a	34.34 ^b	37.22 ^a	100.48 ^a	137.7 ^a
CV.2	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	153.76 ^a	6126.98 ^a	38.5 ^a	62.56 ^a	33.3 ^a	40.56 ^a	95.86 ^a	136.4 ^a
		Con HMA	156.38 ^a	6854.86 ^a	34.8 ^a	66.38 ^a	35.02 ^a	35.5 ^a	101.4 ^a	136.9 ^a
	Pi [1 mM]	Sin HMA	145.88 ^a	6867.66 ^a	45.76 ^a	69.12 ^a	35.0 ^a	39.5 ^a	104.12 ^a	143.62 ^a
		Con HMA	142.16 ^a	6648.72 ^a	37.8 ^a	60.32 ^a	35.62 ^a	37.42 ^a	95.94 ^a	133.36 ^a
CV.3	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	148.5 ^a	5929.46 ^b	41.2 ^a	45.06 ^a	28.94 ^b	26.6 ^b	74.0 ^b	100.6 ^b
		Con HMA	132.94 ^a	6566.46 ^{ab}	30.0 ^a	55.28 ^a	37.2 ^a	40.12 ^{ab}	92.48 ^a	132.6 ^a
	Pi [1 mM]	Sin HMA	126.06 ^a	6664.94 ^{ab}	38.4 ^a	53.24 ^a	36.32 ^a	44.54 ^a	89.56 ^{ab}	134.1 ^a
		Con HMA	116.66 ^a	7139.28 ^a	31.6 ^a	54.48 ^a	38.82 ^a	53.94 ^a	93.3 ^a	147.24 ^a
CV.4	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	174 ^a	4415.86 ^b	31.4 ^b	51.82 ^a	26.92 ^b	24.9 ^a	87.58 ^a	103.64 ^b
		Con HMA	151.94 ^a	5437.04 ^{ab}	29.4 ^b	48.6 ^a	29.62 ^{ab}	24.66 ^a	87.7 ^a	102.88 ^b
	Pi [1 mM]	Sin HMA	156.24 ^a	5168.96 ^{ab}	40.6 ^a	49.68 ^a	29.0 ^b	22.06 ^a	89.4 ^a	100.74 ^b
		Con HMA	132.36 ^a	6381.06 ^a	35.4 ^{ab}	55.48 ^a	34.52 ^a	33.96 ^a	97.28 ^a	123.96 ^a

Notas: Análisis de varianza simple. Se evaluaron 16 tratamientos, resultado de la combinación de cuatro cultivares de maíz (CV.1, 2, 3 y 4) bajo dos concentraciones de Pi (0.01 y 1 mM) y dos condiciones de HMA (sin y con). Para cada tratamiento cada valor corresponde a la media n= 5; Las medias que comparten una letra (^a) son iguales significativamente, con una significancia del $\alpha=0.05$; La Agrupación de la información se realizó utilizando el método de (HSD) de Tukey con una confianza nivel de confianza 95 %.

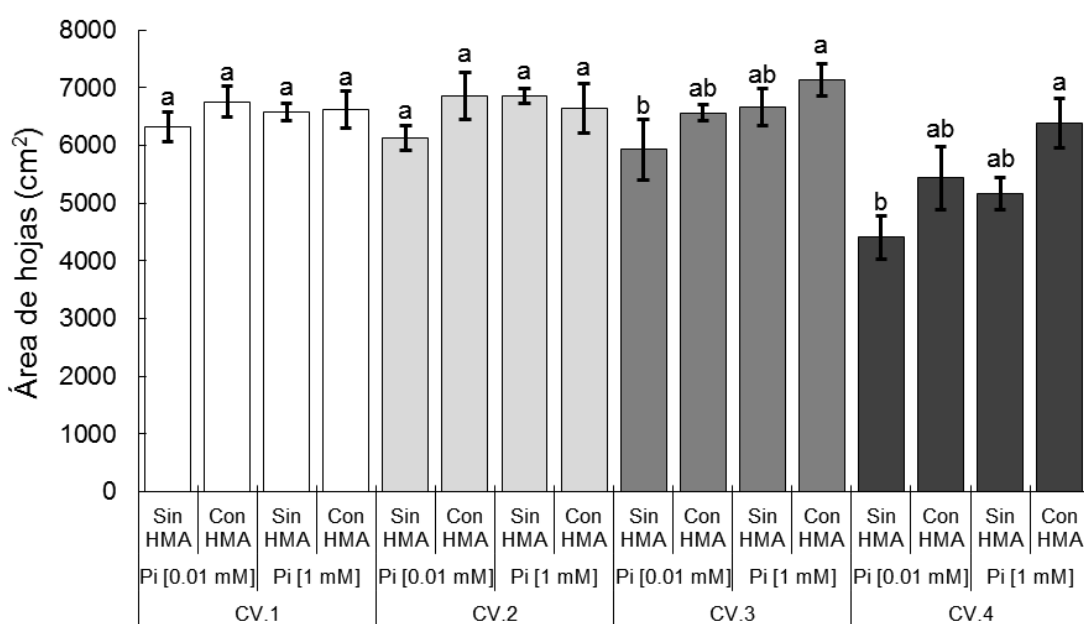


Figura 18. Área de hojas (cm²) entre la combinación de tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

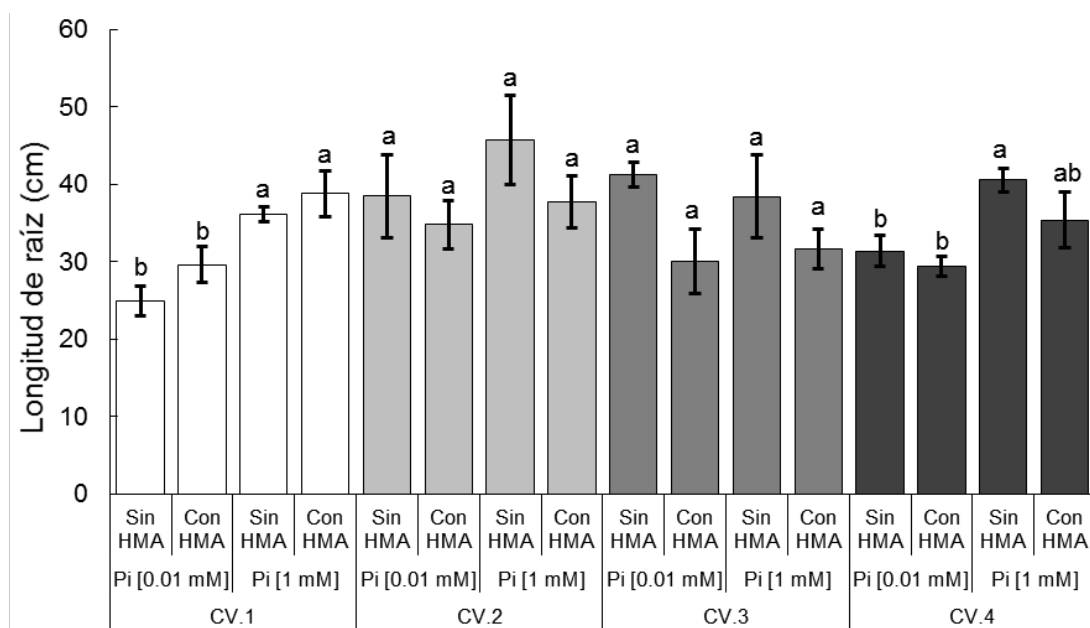


Figura 19. Longitud de raíz (cm) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

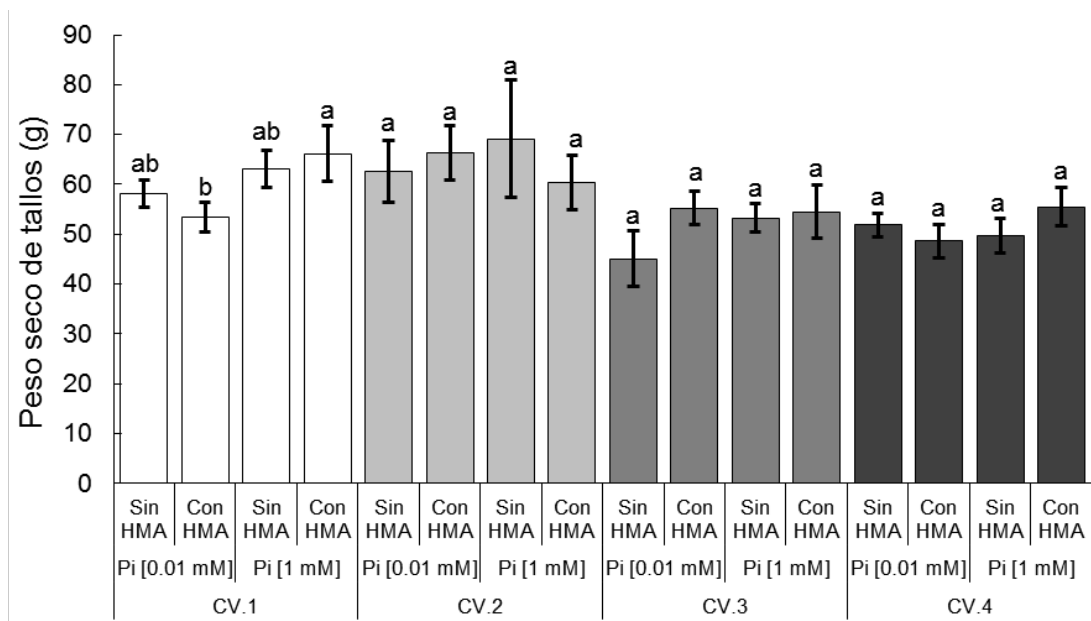


Figura 20. Peso seco de tallos (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

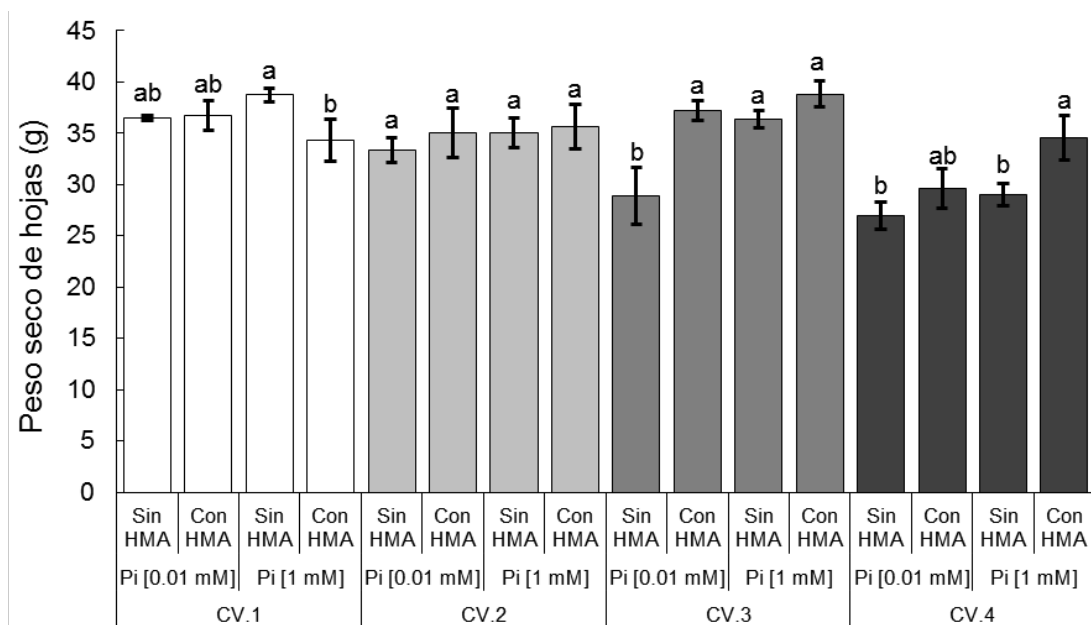


Figura 21. Peso seco de hojas (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

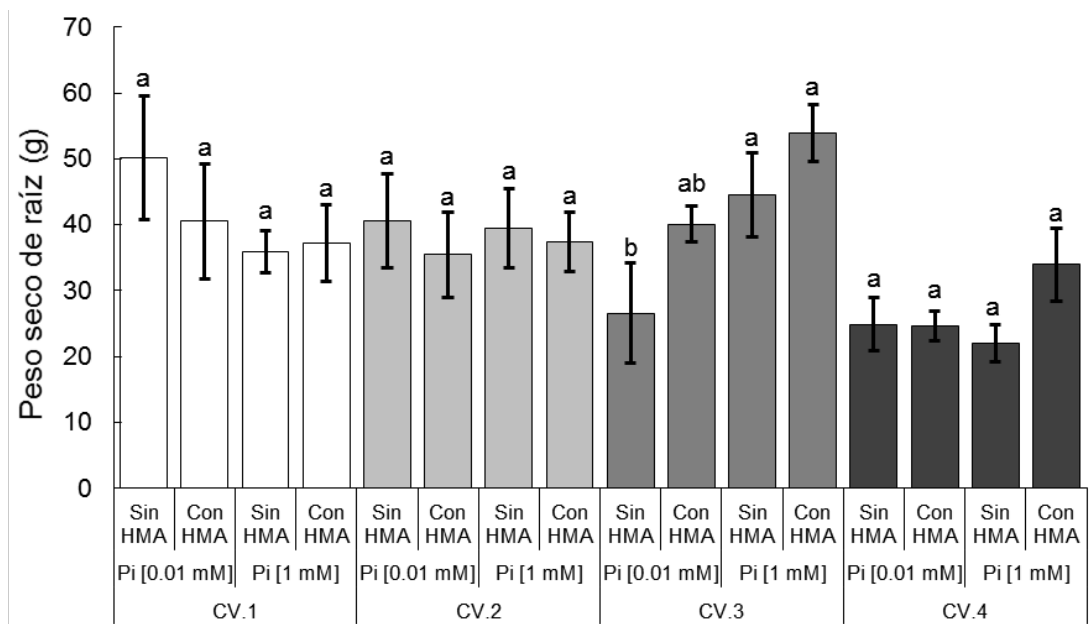


Figura 22. Peso seco de raíz (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

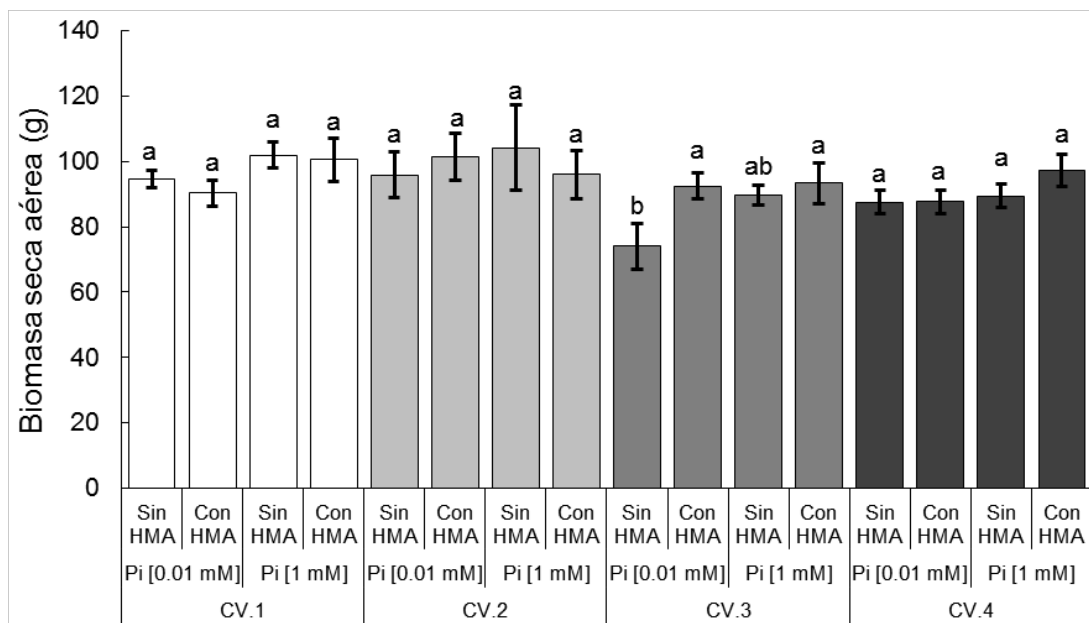


Figura 23. Biomasa seca aérea (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

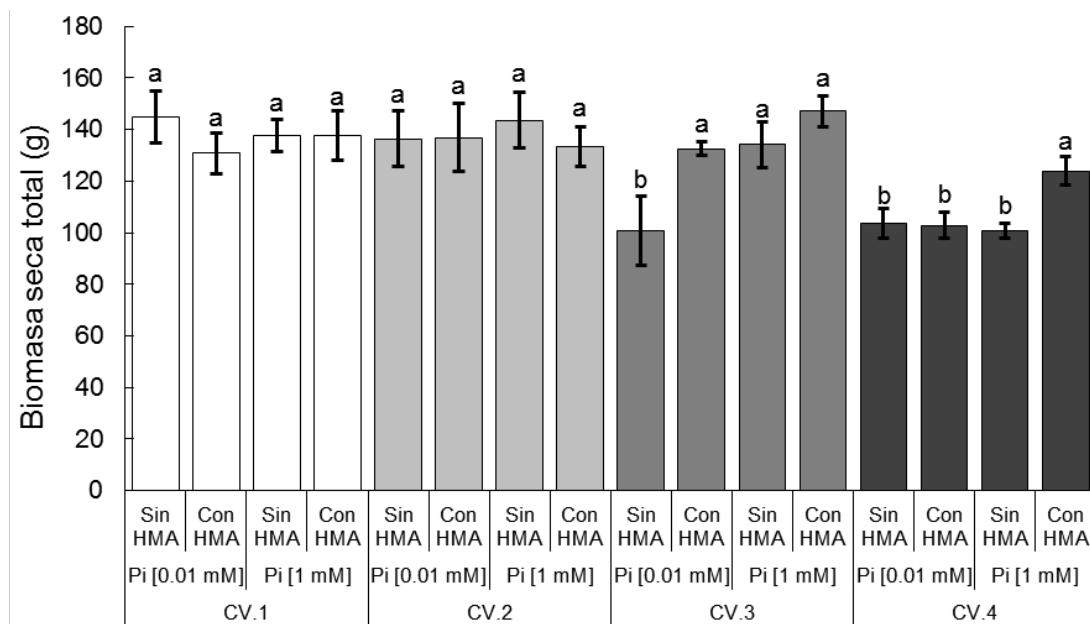


Figura 24. Biomasa seca total (g) entre tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

7.2. Respuesta de modificación fisiológica

7.2.1. Modificación fisiología vegetal entre factores

En la Tabla V se agrupan los resultados del análisis trifactorial y de interacción, para diferentes variables de modificación fisiológica de plantas de maíz a los 75 DDT. Entre los niveles de los factores A y B se observaron diferencias estadísticas para la variable del índice de verdor (U. SPAD). Las unida de SPAD aumentaron significativamente en plantas que crecieron bajo una concentración 1 mM v/s 0.01 mM de P_i (45.4025 v/s 41.9775 U. SPAD), y en plantas sin HMA v/s con HMA (44.8975 v/s 42.4825 U. SPAS) (Fig. 25).

Entro los niveles del factor C se observaron diferencias estadísticas para las variables detasa fotosintética, conductancia estomática y tasa de transpiración. En las tres variables la media del cultivar 4 mostraron un incremento significativo en relación a la del cultivar 3 con 26.4145 v/s 18.1241 $\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para la tasa fotosintética; 0.160498 v/s 0.0947787 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para la conductancia estomática; y 3.37058 v/s 2.26804 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para la tasa de transpiración (Figs. 26 y 27).

Finalmente, las variables de clorofila total ($\mu\text{g mL}^{-1}$), potencial hídrico foliar ($\psi = -\text{Mpa}$) y la contracción de CO_2 Intercelular ($C_i = \mu\text{mol CO}_2\text{mol}^{-1}$), no mostraron diferencias estadísticas entre los niveles de los tres factores sometidos evaluaciones durante este bioensayo.

7.2.2. Modificación fisiológica vegetal por la interacción entre factores

La interacción de los factores A*C y B*C generaron un efecto estadístico sobre las variables de clorofila total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) y potencial hídrico foliar ($\psi = -\text{Mpa}$). Particularmente, pantas del cultivar 1 mostraron un incremento significativo en el contenido de clorofila total cuando crecieron bajo una concentración 1 mM v/s 0.01 mM de P_i (42.08 v/s 34.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$), en contraste, plantas del cultivar 4 redujeron significativamente su contenido de clorofila cuando se desarrollaron bajo la concentración 1 mM v/s 0.01 mM de P_i (38.11 v/s 45.98 $\mu\text{g mL}^{-1}$) respectivamente. Por otro lado, se observó un incremento significativo en el contenido de clorofila

total en plantas de cultivar 1 cuando crecieron asociadas a HMA v/s plantas sin HMA (42.20 v/s 35.96 $\mu\text{g mL}^{-1}$) respectivamente (Fig. 28).

Para la variable de potencial hídrico foliar, plantas del cultivar 2 mostraron un incremento significativo cuando se desarrollaron bajo una concentración 1 mM v/s 0.01 mM de P_i (-2.05 v/s -2.42 Mpa) respectivamente. Mientras que plantas del cultivar 3, mostraron una disminución significativa de su potencial hídrico cuando se desarrollaron en presencia de HMA v/s plantas sin HMA (-2.83 v/s -2.13 Mpa) respectivamente (Fig. 29).

Finalmente, solo la interacción de los factores A*C genero un efecto estadístico sobre las variables de tasa fotosintética, conductancia estomática y tasa de transpiración (Figs. 27 y 30). Para todos los casos, el cultivar 3 mostro un incremento significativo de estas variables cuando sus plantas se desarrollaron bajo una concentración 0.01 mM v/s 1 mM de P_i , siendo; 23.62 v/s 12.62 $\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para la tasa fotosintética; 0.127 v/s 0.062 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para la conductancia estomática; y 2.895 v/s 1.640 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para la tasa de transpiración.

Tabla V. Análisis factorial de la modificación fisiología de plantas de maíz a los 75 DDT.

	Clorofila total ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Índice de verdor (U. SPAD)	Potencial hídrico ($\psi = -\text{Mpa}$)	Tasa fotosintética ($A = \mu\text{mol}$ $\text{CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Conductancia estomática ($g_s = \text{mol}$ $\text{H}_2\text{O} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Tasa transpiratoria ($E = \text{mmol}$ $\text{H}_2\text{O} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	CO_2 Intercelular ($C_i = \mu\text{mol}$ $\text{CO}_2 \text{mol}^{-1}$)
Factor A: Concentración de Pi							
Pi [0.01 mM)	40.0368 ^a	41.9775 ^b	-2.278 ^a	23.5383 ^a	0.138246 ^a	2.99826 ^a	16.259 ^a
Pi [1 mM)	39.7361 ^a	45.4025 ^a	-2.27225 ^a	21.0078 ^a	0.117612 ^a	2.65457 ^a	14.1794 ^a
Factor B: Condición de HMA							
Con HMA	39.3448 ^a	42.4825 ^b	-2.36425 ^a	22.0902 ^a	0.127024 ^a	2.83421 ^a	14.2731 ^a
Sin HMA	40.4281 ^a	44.8975 ^a	-2.186 ^a	22.4559 ^a	0.128835 ^a	2.81862 ^a	16.1654 ^a
Factor C: Cultivar de maíz							
CV.1	39.084 ^a	45.3 ^a	-2.2625 ^a	22.4852 ^{ab}	0.128781 ^{ab}	2.77668 ^{ab}	18.2391 ^a
CV.2	39.15 ^a	42.905 ^a	-2.1475 ^a	22.0684 ^{ab}	0.127658 ^{ab}	2.89036 ^{ab}	16.8133 ^a
CV.3	40.2062 ^a	43.9 ^a	-2.483 ^a	18.1241 ^b	0.0947787 ^b	2.26804 ^b	8.66589 ^a
CV.4	41.1056 ^a	42.655 ^a	-2.2075 ^a	26.4145 ^a	0.160498 ^a	3.37058 ^a	17.1587 ^a
Interacción A*B							
Razón-F	0.95	0.32	1.70	0.55	0.01	0.17	0.88
Valor de P	0.3344	0.5729	0.1971	0.4605	0.9282	0.6809	0.3525
Interacción A*C							
Razón-F	2.74	0.36	2.30	5.60	3.58	3.85	0.64
Valor de P	0.0507	0.7799	0.0858	0.0018*	0.0185*	0.0135*	0.5937
Interacción B*C							
Razón-F	3.29	0.60	4.16	0.55	1.03	0.52	1.13
Valor de P	0.0263*	0.6151	0.0094*	0.6490	0.3869	0.6712	0.3446
Interacción A*B*C							
Razón-F	0.41	0.67	0.90	1.58	2.21	1.57	0.38
Valor de P	0.7494	0.5709	0.4446	0.2022	0.0955	0.2057	0.7661

Notas: Análisis trifactorial y de interacciones. A) concentraciones de Pi (dos niveles); B) condiciones de HMA (dos niveles) y C) cultivar de maíz (cuatro niveles). Cada valor corresponde a la media $n = 40$ (factores A y B), $n = 20$ (factor C). Las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$; La Agrupación de la información se realizó utilizando el método de (HSD) de Tukey con una confianza del 95.0 %. Para las interacciones los valores-P menores a 0.05 (*) prueban un efecto estadístico entre los factores. ¹ Días Después del Trasplante.

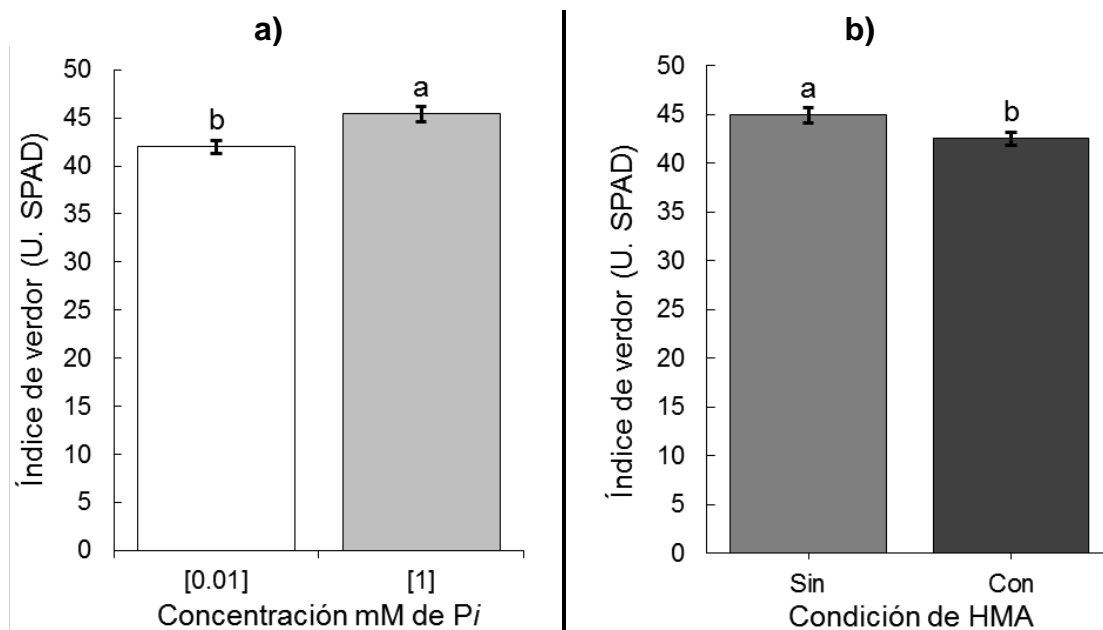


Figura 25. Índice de verdor (U. SPAD) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de P_i y b) condición de HMA. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

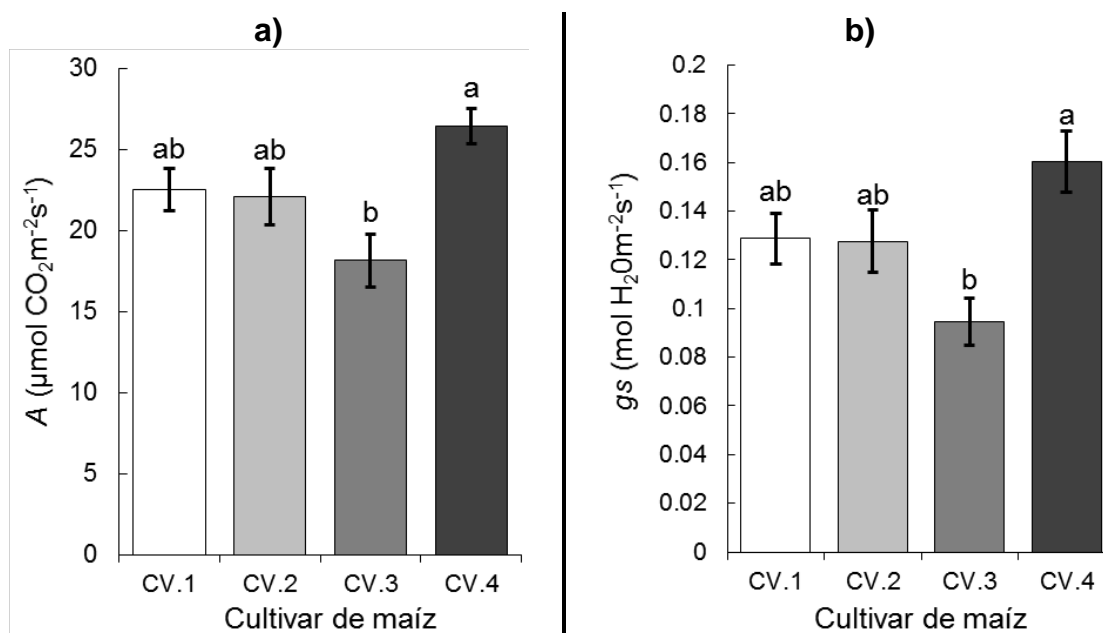


Figura 26. Tasa fotosintética ($A = \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (a) y conductancia estomática ($g_s = \text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (b) a los 75 DDT para el factor cultivar de maíz. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

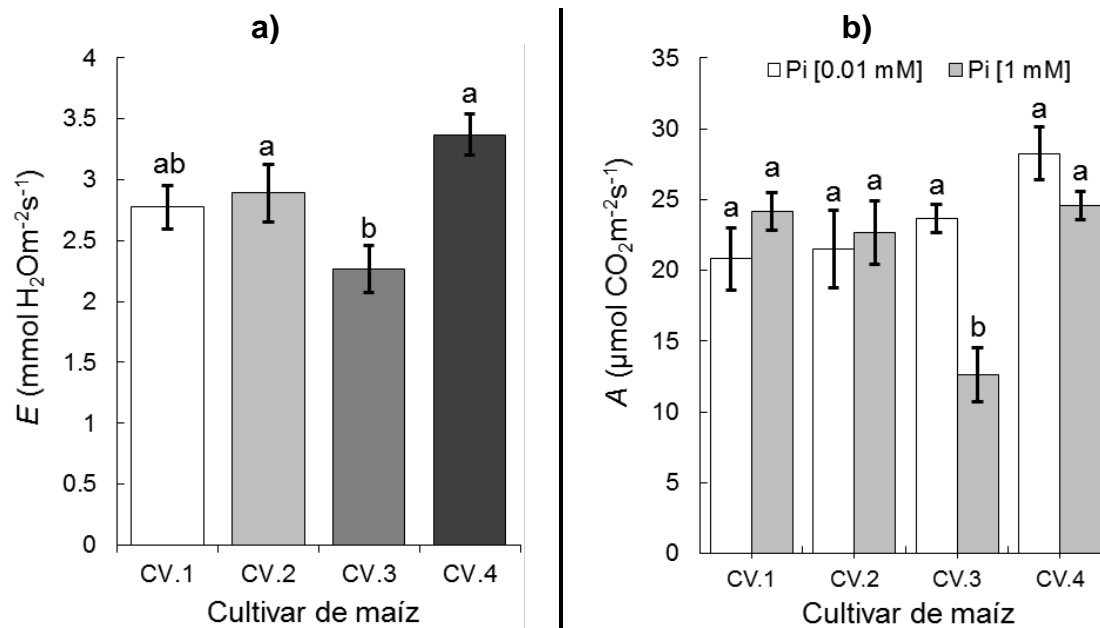


Figura 27. Tasa transpiratoria ($E = \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) para el factor cultivar de maíz (a); Tasa fotosintética ($A = \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) entre la interacción de los factores A*C (b). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

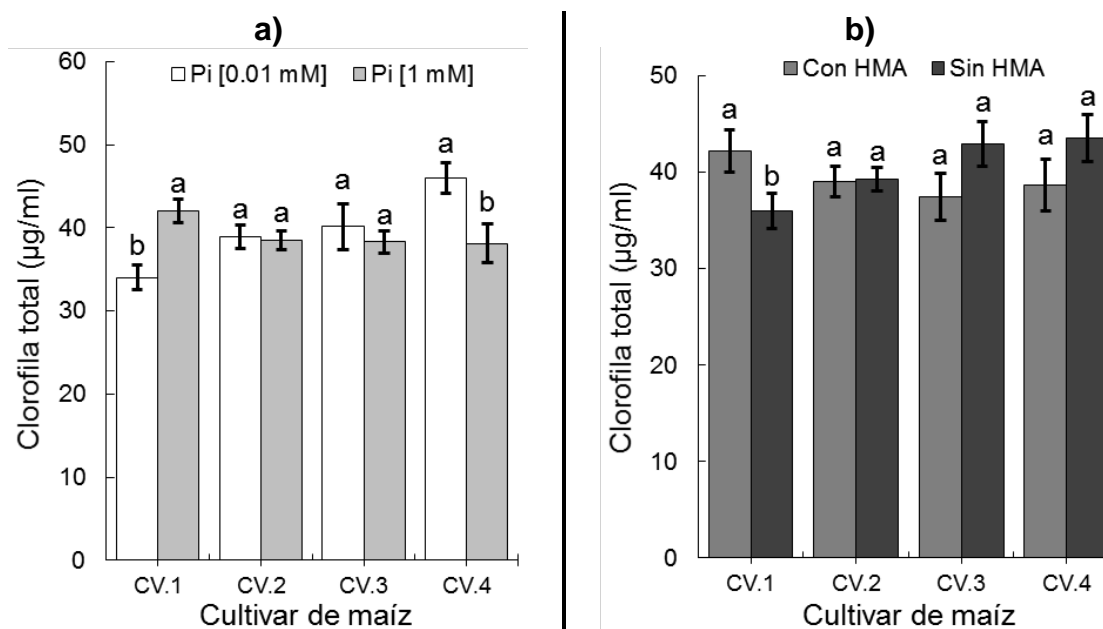


Figura 28. Clorofila total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre la interacción de los factores: a) A*C, y b) B*C. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

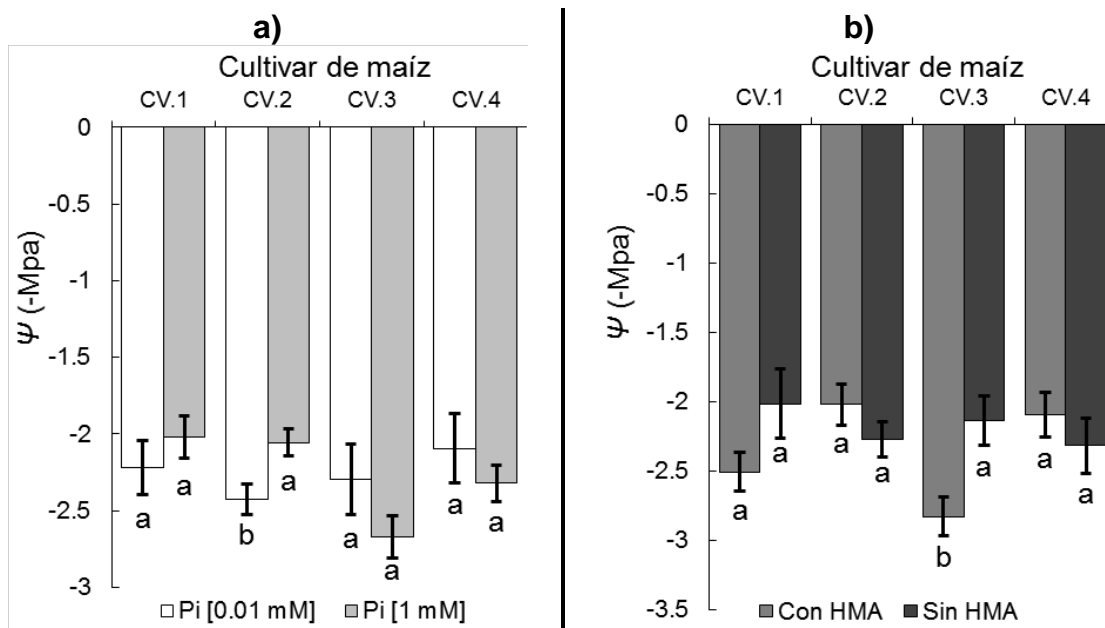


Figura 29. Potencial hídrico foliar ($\psi = -\text{Mpa}$) entre la interacción de los factores: a) A*C, y b) B*C. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

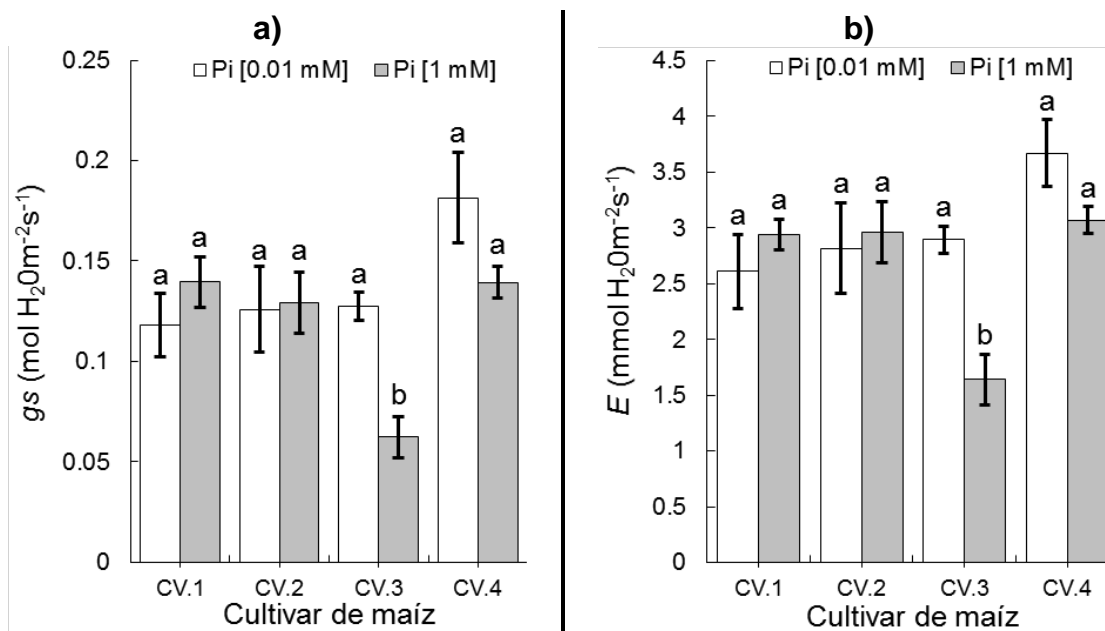


Figura 30. Conductancia estomática ($g_s = \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (a) y tasa transpiratoria ($E = \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (b) entre la interacción de factores A*C. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

7.2.3. Respuesta de modificación fisiológica vegetal entre tratamientos

En la Tabla VI se agrupan los resultados del análisis de varianza entre tratamientos para las diferentes variables de modificación fisiológica vegetal de plantas de maíz a los 75 DDT. Un total de 16 tratamientos fueron analizados como resultado de la combinación de los cuatro cultivares de maíz, las dos concentraciones de *Pi* (1 y 0.01 mM) y las dos condiciones de HMA (con y sin).

Para las variables de clorofila total e índice de verdor, se observaron diferencias estadísticas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 1 y 3 respectivamente, para ambos casos la condición de HMA genero la mayor variabilidad entre los tratamientos. Para la variable de clorofila total el tratamiento CV.1/*Pi* [0.01mM]/Sin HMA ($31.1585 \mu\text{g mL}^{-1}$) presento el menor efecto estadístico dentro los tratamientos del cultivar 1 (Fig. 31). Mientras que en la variable de índice de verdor, el tratamiento CV.3/*Pi* [1mM]/Sin HMA (49.42 U. SPAD) genero el mayor efecto estadístico dentro el grupo de tratamiento del cultivar 3 (Fig. 32).

Para la variable de potencial hídrico foliar, se observaron diferencias estadísticas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 2 y 3, para ambos casos la condición de HMA genero la mayor variabilidad entre tratamientos. Para el grupo de tratamientos del cultivar 2 el tratamiento CV.2/*Pi* [0.01mM]/Sin HMA (-2.59 Mpa) presento el menor efecto estadístico. Mientras que el tratamiento CV.3/*Pi* [0.01mM]/Sin HMA (-1.85 Mpa) presento el mayor efecto estadístico dentro los tratamientos del cultivar 3 (Fig. 33).

Para la variable de tasas fotosintética, se observaron diferencias estadísticas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 3 y 4. Para el cultivar 3, la condición de *Pi* genero la mayor variabilidad entre los tratamientos donde, plantas con y sin HMA que crecieron en la concentración 0.01 mM de *Pi*, (22.80 y $24.43 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), mantuvieron un incremento estadístico en relación a plantas con y sin HMA que se desarrollaron en la concentración 1 mM de *Pi* (13.88 y $11.36 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Para el cultivar 4, la combinación de los factores concentración de *Pi* y condición de HMA genero la mayor variabilidad entre los tratamientos donde, el tratamiento CV.4/*Pi* [0.01mM]/Con HMA ($31.0044 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

mantuvo un incremento estadístico con relación al tratamiento CV.4/Pi [1mM]/Con HMA ($23.8814 \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Fig. 34).

Para la variable de conductancia estomática, se observaron diferencias estadísticas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 3 y 4. Para el cultivar 3, la condición de *Pi* genero la mayor variabilidad entre los tratamientos donde, plantas con y sin HMA que crecieron en la concentración 0.01 mM de *Pi*, (0.1208 y $0.1338 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), mantuvieron un incremento estadístico en relación a plantas con y sin HMA que se desarrollaron en la concentración 1 mM de *Pi* (0.069 y $0.0554 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Para el cultivar 4, la combinación de los factores concentración de *Pi* y condición de HMA genero la mayor variabilidad entre tratamientos donde, el tratamiento CV.4/Pi [0.01mM]/Con HMA ($0.2146 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) mantuvo un incremento estadístico con relación al tratamiento CV.4/Pi [1mM]/Con HMA ($0.1332 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Fig. 35).

Finalmente, para la variable de la tasa transpiratoria se observaron diferencias estadísticas entre la combinación de tratamientos de los cultivares 3 y 4. Para el cultivar 3, la condición de *Pi* genero la mayor variabilidad entre los tratamientos donde, plantas con y sin HMA que crecieron en la concentración 0.01 mM de *Pi*, (2.7993 y $2.9922 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), mantuvieron un incremento estadístico en relación a plantas con y sin HMA que se desarrollaron en la concentración 1 mM de *Pi* (1.7492 y $1.5312 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Para el cultivar 4, la combinación de los factores concentración de *Pi* y condición de HMA genero la mayor variabilidad entre los tratamientos donde, el tratamiento CV.4/Pi [0.01mM]/Con HMA ($4.1239 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) mantuvo un incremento estadístico con relación a los tratamientos CV.4/Pi [1mM]/Sin y Con HMA (3.1390 y $3.0027 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) respectivamente (Fig. 36).

Tabla VI. Respuesta entre tratamientos de la modificación fisiología de plantas de maíz a los 75 DDT¹.

Tratamiento		Clorofila total ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice de verdor (U. SPAD)	Potencial hídrico ($\psi = -\text{Mpa}$)	Tasa fotosintética ($A = \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Conductancia estomática ($g_s = \text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Tasa transpiratoria ($E = \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	CO ₂ Intercelular ($C_i = \mu\text{mol CO}_2\text{mol}^{-1}$)	
CV.1	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	31.1585 ^b	44.16 ^a	-2.272 ^a	22.3332 ^a	0.121289 ^a	2.6686 ^a	14.6385 ^a
		Con HMA	41.0141 ^a	42.76 ^a	-2.5 ^a	19.2959 ^a	0.114947 ^a	2.5497 ^a	26.9174 ^a
	Pi [1 mM]	Sin HMA	40.7674 ^a	48.34 ^a	-1.762 ^a	24.9227 ^a	0.147616 ^a	2.97919 ^a	16.6149 ^a
		Con HMA	43.396 ^a	45.94 ^a	-2.516 ^a	23.3891 ^a	0.131274 ^a	2.90923 ^a	14.7856 ^a
CV.2	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	38.689 ^a	41.86 ^a	-2.59 ^b	24.6278 ^a	0.154898 ^a	3.23815 ^a	26.5193 ^a
		Con HMA	40.88 ^a	39.3 ^a	-2.08 ^{ab}	18.3178 ^a	0.0970442 ^a	2.39759 ^a	11.7402 ^a
	Pi [1 mM]	Sin HMA	39.8823 ^a	44.94 ^a	-1.956 ^a	21.1903 ^a	0.123493 ^a	2.78392 ^a	22.4516 ^a
		Con HMA	37.1486 ^a	45.52 ^a	-1.964 ^a	24.1379 ^a	0.135198 ^a	3.14178 ^a	6.54186 ^a
CV.3	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	43.0797 ^a	43.12 ^b	-1.858 ^a	24.4329 ^a	0.133822 ^a	2.9922 ^a	6.53995 ^a
		Con HMA	37.2815 ^a	40.98 ^b	-2.736 ^b	22.8086 ^a	0.120834 ^a	2.79937 ^a	1.85064 ^a
	Pi [1 mM]	Sin HMA	42.8078 ^a	49.42 ^a	-2.414 ^{ab}	11.3682 ^b	0.0554308 ^b	1.53128 ^b	14.1859 ^a
		Con HMA	37.6555 ^a	42.08 ^b	-2.924 ^b	13.8865 ^b	0.0690278 ^b	1.74929 ^b	12.0871 ^a
CV.4	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	46.4869 ^a	42.42 ^a	-2.346 ^a	25.486 ^{ab}	0.148507 ^{ab}	3.21652 ^{ab}	12.3732 ^a
		Con HMA	41.7048 ^a	41.22 ^a	-1.842 ^a	31.0044 ^a	0.214631 ^a	4.12396 ^a	29.493 ^a
	Pi [1 mM]	Sin HMA	40.5534 ^a	44.92 ^a	-2.29 ^a	25.2863 ^{ab}	0.145622 ^{ab}	3.13909 ^b	15.9998 ^a
		Con HMA	35.6775 ^a	42.06 ^a	-2.352 ^a	23.8814 ^b	0.133233 ^b	3.00276 ^b	10.7687 ^a

Notas: Análisis de varianza simple. Se evaluaron 16 tratamientos, resultado de la combinación de cuatro cultivares de maíz (CV.1, 2, 3 y 4) bajo dos concentraciones de Pi (0.01 y 1 mM) y dos condiciones de HMA (sin y con). Para cada tratamiento cada valor corresponde a la media n= 5; Las medias que comparten una letra (^a) son iguales significativamente, con una significancia del $\alpha=0.05$; La Agrupación de la información se realizó utilizando el método de (HSD) de Tukey con una confianza nivel de confianza 95 %. ¹ Días después de trasplante.

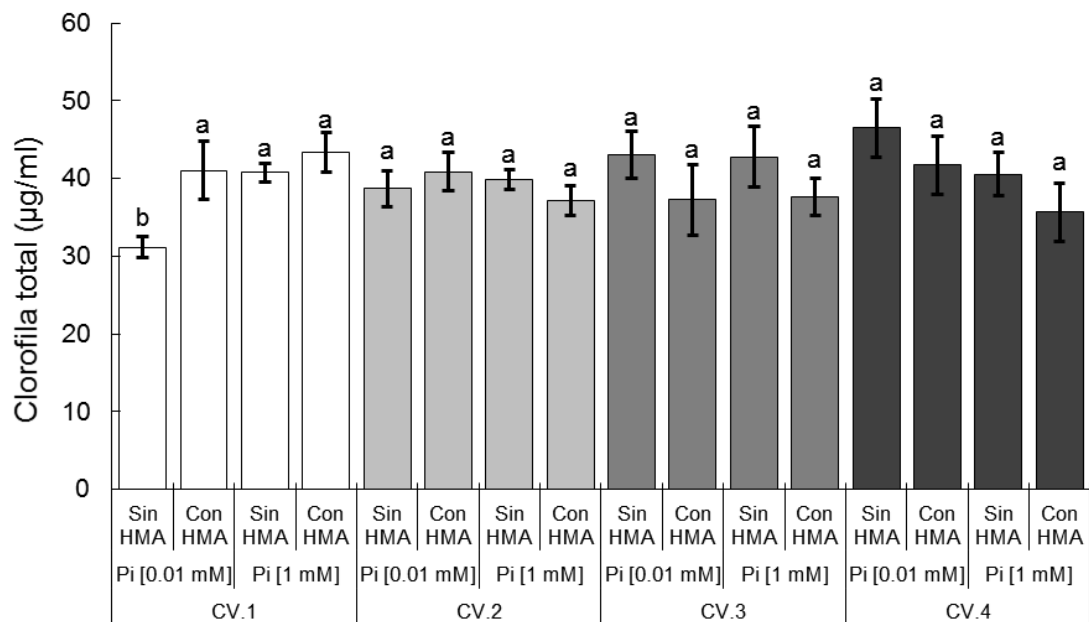


Figura 31. Clorofila total ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

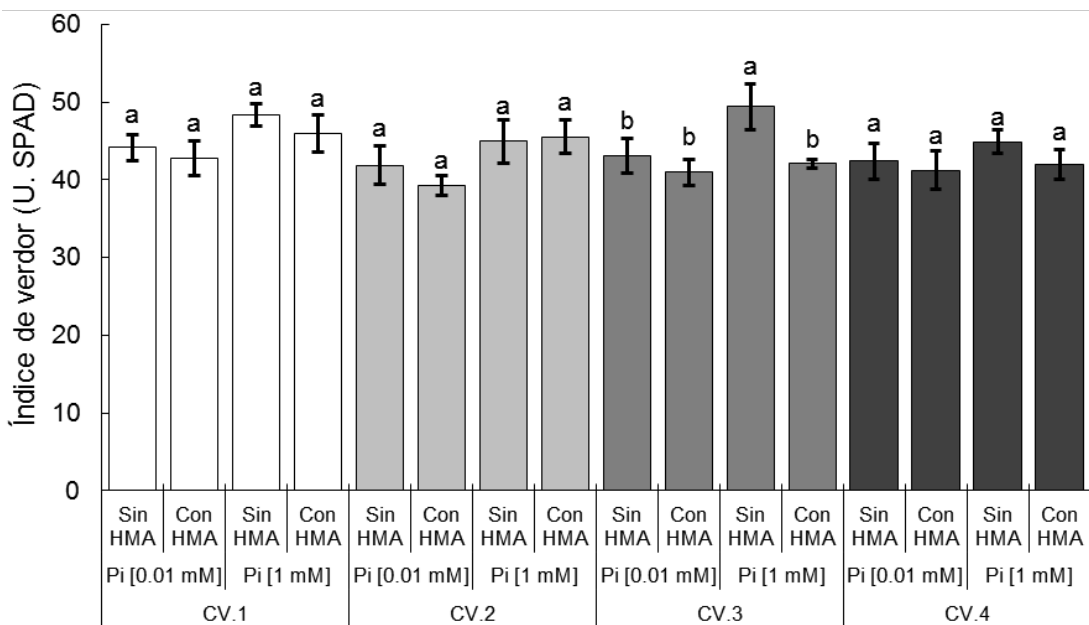


Figura 32. Índice de verdor (U. SPAD) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

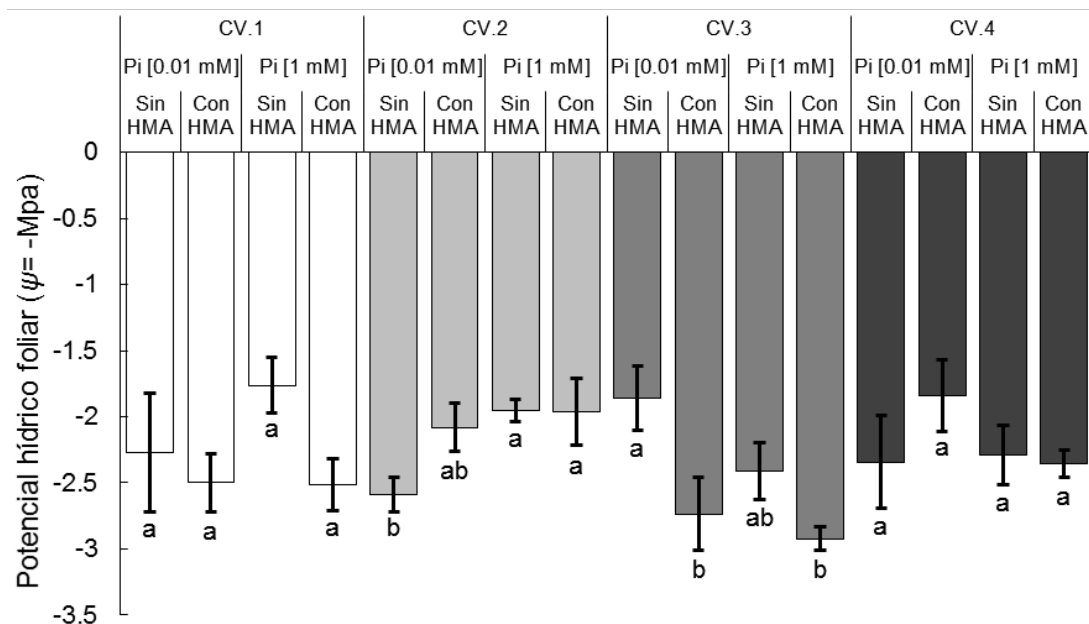


Figura 33. Potencial hídrico foliar ($\psi = -\text{Mpa}$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

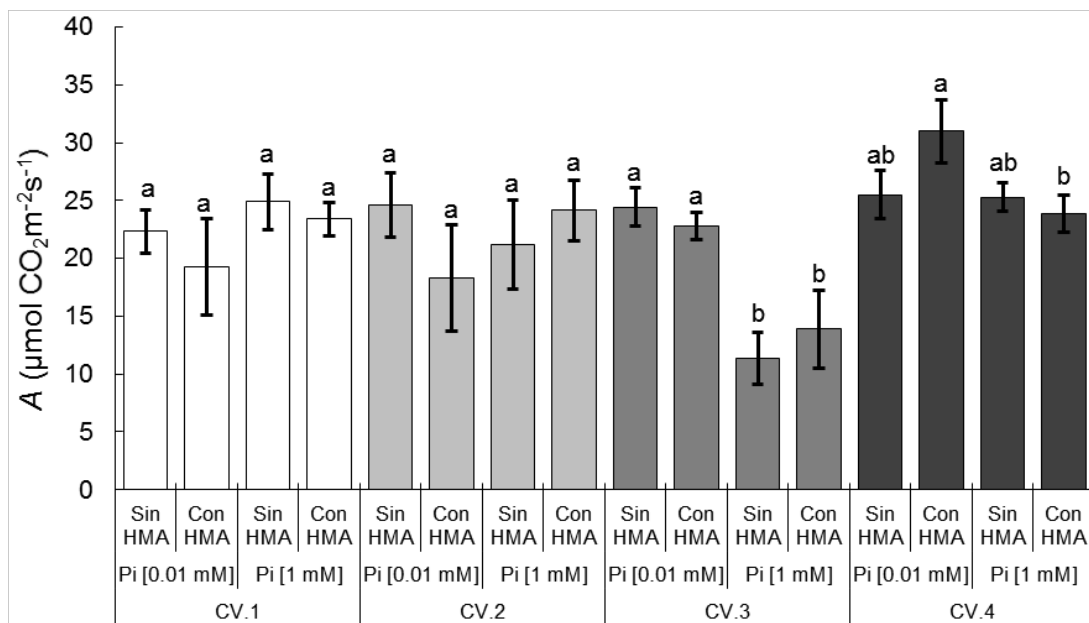


Figura 34. Tasa fotosintética ($A = \mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

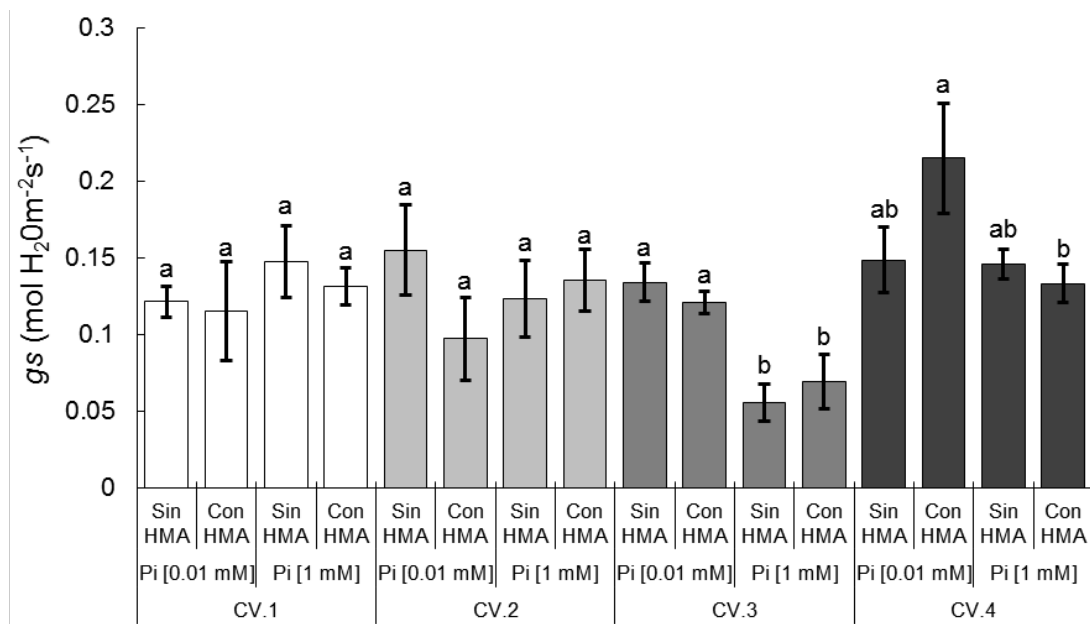


Figura 35. Conductancia estomática ($g_s = \text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

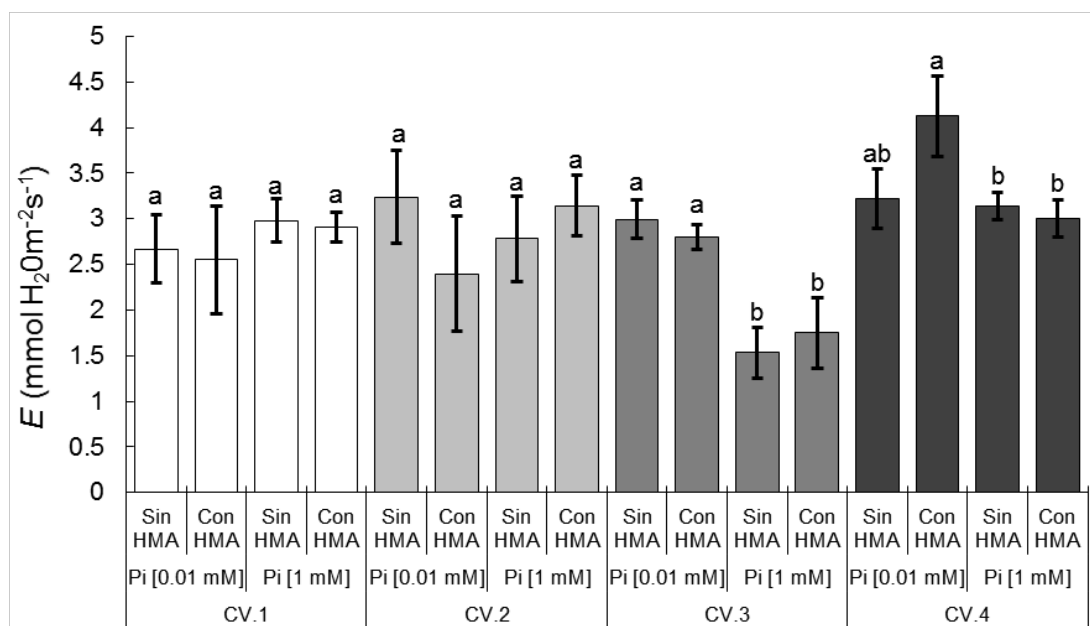


Figura 36. Tasa transpiratoria ($E = \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) entre tratamientos para cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

7.3. Respuesta de variables microbiológicas

7.3.1. Variables microbiológicas entre factores

En la Tabla VII se agrupan los resultados del análisis trifactorial y de interacción, de diferentes variables microbiológicas en plantas de maíz a los 75 DDT. Entre los niveles de los factores A y B, se observaron diferencias estadísticas para las variables de colonización de HMA en raíz (%) y N° de esporas (10 g/suelo). En la (Fig. 37) se muestran raíces de plantas de maíz teñidas con azul de Trypan en donde se aprecia la colonización de HMA en a los 75 DDT, particularmente, se observan hifas del micelio intra y extra radical, esporas, vesículas y arbusculos.

La variable del % de colonización incremento significativamente en plantas que crecieron bajo la concentración de 0.01 mM v/s 1 mM de *Pi* (32.45 v/s 24.33 %) respectivamente, así como en plantas inoculadas con HMA v/s sin HMA (56.5 v/s 0.29 %) respectivamente (Fig. 38). De igual manera, la variable de N° de esporas incremento significativamente en plantas que crecieron bajo la concentración de 0.01 mM v/s 1 mM de *Pi* (8.375 v/s 5.416 N° de esporas) respectivamente, así como en plantas inoculadas con HMA v/s sin HMA (13.45 v/s 0.33 N° de esporas) respectivamente (Fig. 39).

7.3.2. Variables microbiológicas por la interacción entre factores

La interacción entre los factores A*B, genero un efecto estadístico sobre las variables del % de colonización y N° de esporas. Particularmente, ambas variables mostraron un incremento significativo en la concentración 0.01 mM v/s 1 mM con 64.75 y 42.25 % de colonización (respectivamente), y 16.33 y 10.58 N° de esporas en 10 g/suelo (respectivamente) (Fig. 40). Finalmente, entre los cuatro niveles del factor C y la interacción entre los factores A*B, B*C y A*B*C, no se generó diferencias estadísticas.

7.3.3. Variables microbiológicas entre tratamientos

En la Tabla VIII se agrupan los resultados del análisis de varianza entre tratamientos para las diferentes variables microbiológicas evaluadas en plantas de maíz a los 75 DDT. Para la variable de % de colonización, todos los tratamientos que involucraban la presencia de HMA presentaron altos niveles de colonización

en raíces que iban de 42 a 71.33 %. Por otro lado, ningún cultivar presentó variaciones en los índices de colonización por las concentraciones bajas o altas de *Pi*. Particularmente se observó un incremento estadístico del tratamiento CV.2/*Pi* [1mM]/Con HMA (71.3 %), con relación a los tratamientos CV.4/*Pi* [0.01mM]/Con HMA (46.0 %) y CV.3/*Pi* [0.01mM]/Con HMA (42.0 %), siendo este último el de menor efecto estadístico (Fig. 41).

Para la variable de N° de esporas, todos los tratamientos que involucraban la presencia de HMA presentaron altos niveles de esporas en suelo que iban de los 9.3 a 19.7 N° de esporas (10 g/suelo). Por otro lado, se observaron variaciones en el N° de espora por las concentraciones de *Pi* donde, el cultivar 1 mantuvo un incremento significativo en plantas desarrolladas bajo 1 mM v/s 0.01 mM *Pi* (16 v/s 12 N° de esporas). Finalmente, se observó un incremento estadístico del tratamiento CV.2/*Pi* [1mM]/Con HMA (19.7 N°) con relación a los tratamientos CV.3/*Pi* [1mM]/Con HMA (9.7 N°) y CV.4/*Pi* [0.01mM]/Con HMA (9.3 N°) (Fig. 42).

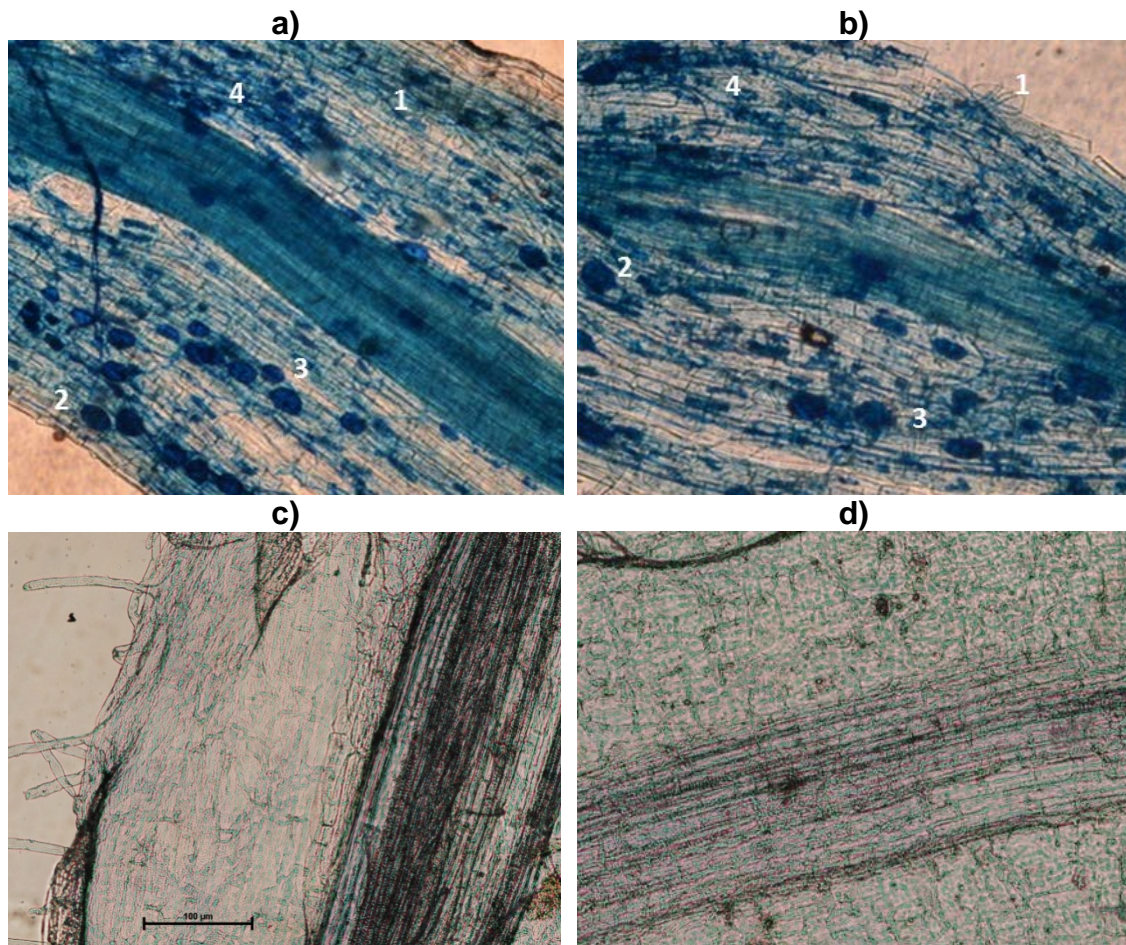


Figura 37. Colonización del HMA *Claroideoglossum etunicatum* en raíces de plantas de maíz a los 75 DDT (a y b); raíces de plantas de maíz sin colonización de HMA a los 75 DDT (c y d). ¹hifas de micelio intra/extra radical; ²Esporas; ³vesículas; ⁴arbusculos.

Tabla VII. Análisis factorial de variables microbiológicas en plantas de maíz a los 75 DDT.

	% de colonización	N° de esporas (10 g/suelo)
Factor A: Concentración de <i>Pi</i>		
<i>Pi</i> [0.01 mM)	32.4583 ^a	8.375 ^a
<i>Pi</i> [1 mM)	24.3333 ^b	5.41667 ^b
Factor B: Condición de HMA		
Con HMA	56.5 ^a	13.4583 ^a
Sin HMA	0.291667 ^b	0.3333 ^b
Factor C: Cultivar de maíz		
CV.1	26.5833 ^a	5.66667 ^a
CV.2	26.8333 ^a	6.58333 ^a
CV.3	28.1667 ^a	7.0 ^a
CV.4	32.0 ^a	8.33333 ^a
Interacción A*B		
Razón- <i>F</i>	15.23	9.43
Valor de <i>P</i>	0.0005*	0.00403*
Interacción A*C		
Razón- <i>F</i>	0.63	0.88
Valor de <i>P</i>	0.603	0.4637
Interacción B*C		
Razón- <i>F</i>	1.41	1.33
Valor de <i>P</i>	0.2587	0.2819
Interacción A*B*C		
Razón- <i>F</i>	0.56	0.46
Valor de <i>P</i>	0.6456	0.715

Notas: Análisis trifactorial y de interacciones. Cada valor corresponde a la media $n = 24$ (factores A y B), $n = 12$ (factor C). Las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$; La agrupación de la información se realizó utilizando el método de (HSD) de Tukey con una confianza del 95 %. Para las interacciones los valores-*P* menores a 0.05 (*) prueban un efecto estadístico entre los factores. ¹ Días Después del Trasplante.

Tabla VIII. Respuesta entre tratamientos de variables microbiológicas en plantas de maíz a los 75 DDT.

Tratamiento		% de colonización	N° de esporas (10 g/suelo)
CV.1	<i>Pi</i> [0.01 mM]	Sin HMA	0.0 ^d
		Con HMA	64.3 ^{abc}
	<i>Pi</i> [1 mM]	Sin HMA	0.7 ^d
		Con HMA	56.7 ^{abc}
CV.2	<i>Pi</i> [0.01 mM]	Sin HMA	0.0 ^d
		Con HMA	66.7 ^{ab}
	<i>Pi</i> [1 mM]	Sin HMA	0.0 ^d
		Con HMA	71.3 ^a
CV.3	<i>Pi</i> [0.01 mM]	Sin HMA	0.0 ^d
		Con HMA	42.0 ^c
	<i>Pi</i> [1 mM]	Sin HMA	1.0 ^d
		Con HMA	49.0 ^{abc}
CV.4	<i>Pi</i> [0.01 mM]	Sin HMA	0.0 ^d
		Con HMA	46.0 ^{bc}
	<i>Pi</i> [1 mM]	Sin HMA	0.7 ^d
		Con HMA	56.0 ^{abc}

Notas: Análisis de varianza simple. Se evaluaron 16 tratamientos, resultado de la combinación de cuatro cultivares de maíz (CV.1, 2, 3 y 4) bajo dos concentraciones de *Pi* (0.01 y 1 mM) y dos condiciones de HMA (sin y con). Para cada tratamiento cada valor corresponde a la media $n = 5$; Las medias que comparten una letra (^a) son iguales significativamente, con una significancia del $\alpha = 0.05$; La agrupación de la información se realizó utilizando el método de (HSD) de Tukey con una confianza nivel de confianza 95 %. ¹ Días después de trasplante.

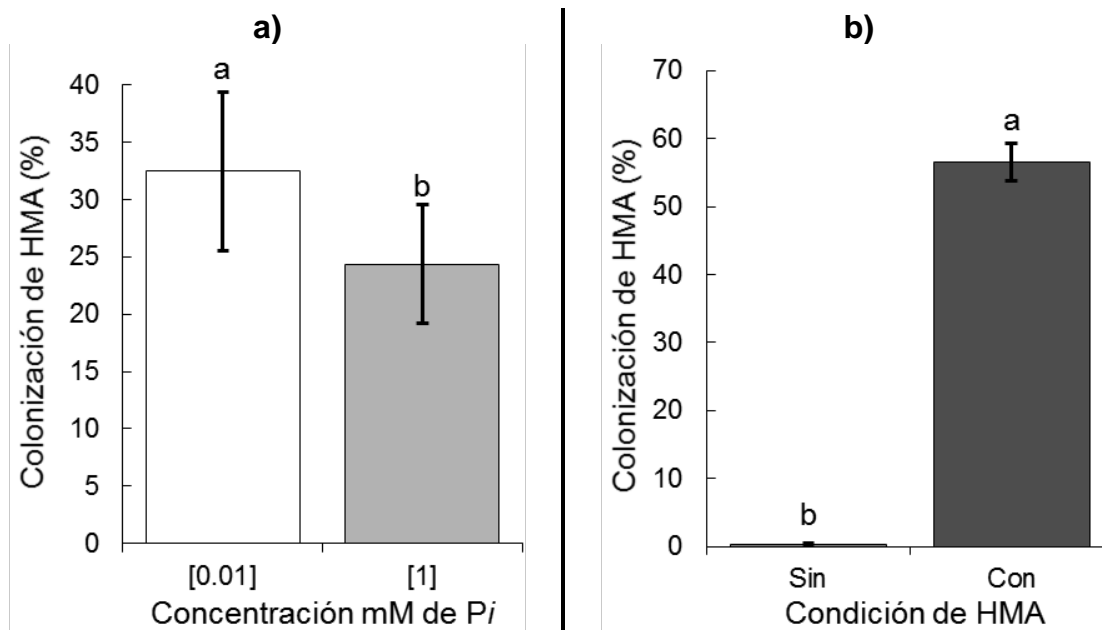


Figura 38. Colonización de HMA (%) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de P_i y b) condición de HMA. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

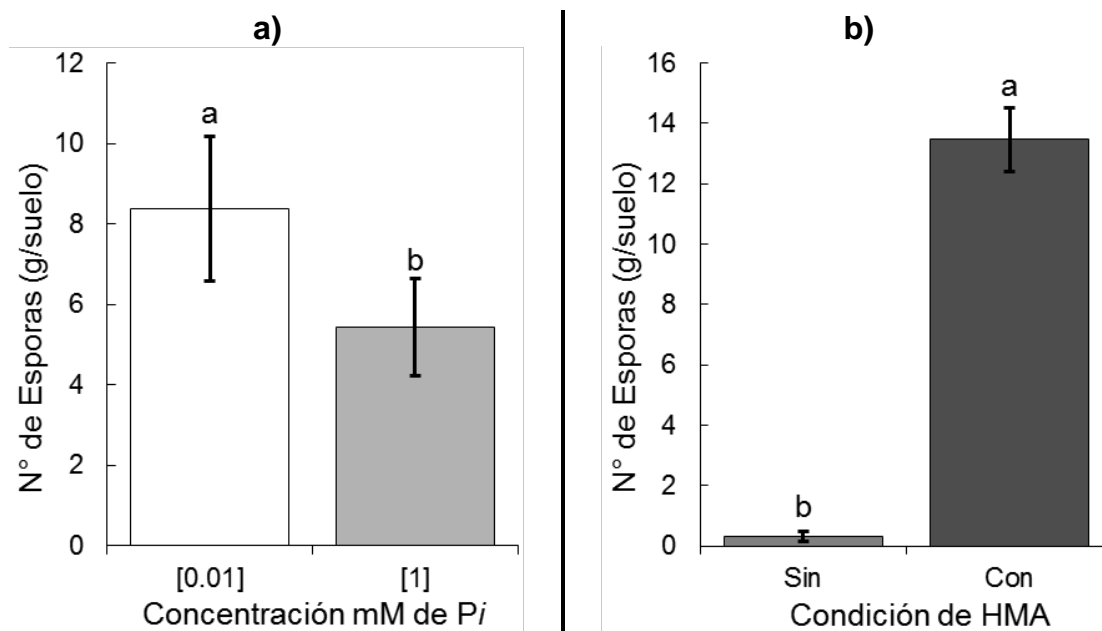


Figura 39. Nº de esporas (10 g/suelo) a los 75 DDT para los factores: a) concentración de P_i y b) condición de HMA. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

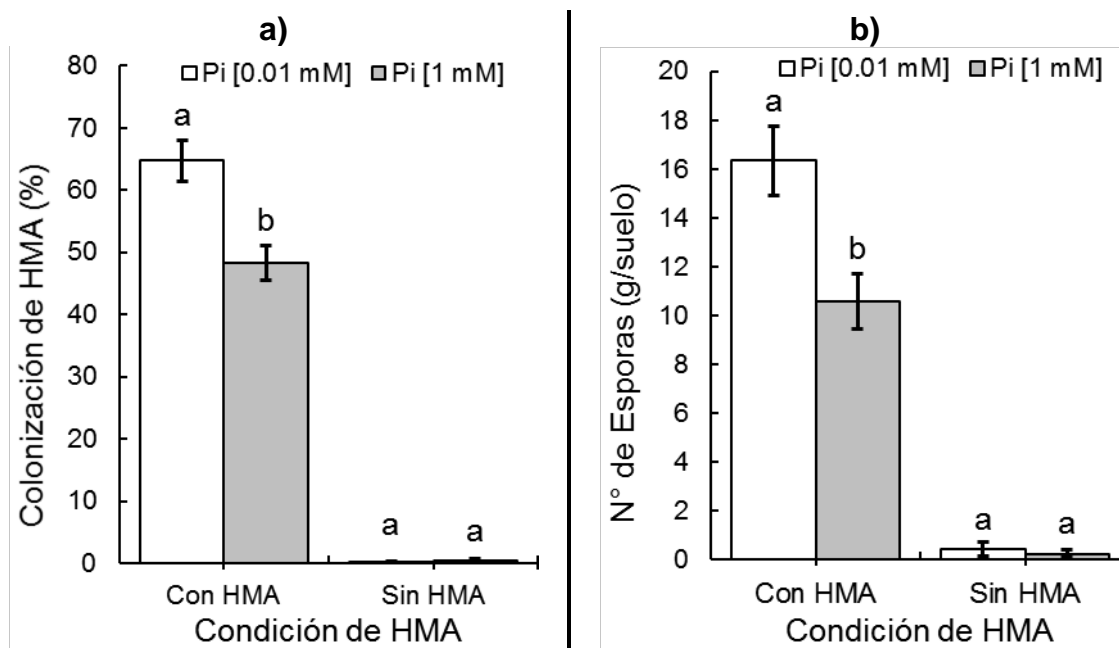


Figura 40. Interacción entre los factores B*C para las variables: a) colonización de HMA (%), y b) N° de esporas (10 g/suelo). Entre los niveles de cada factor, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

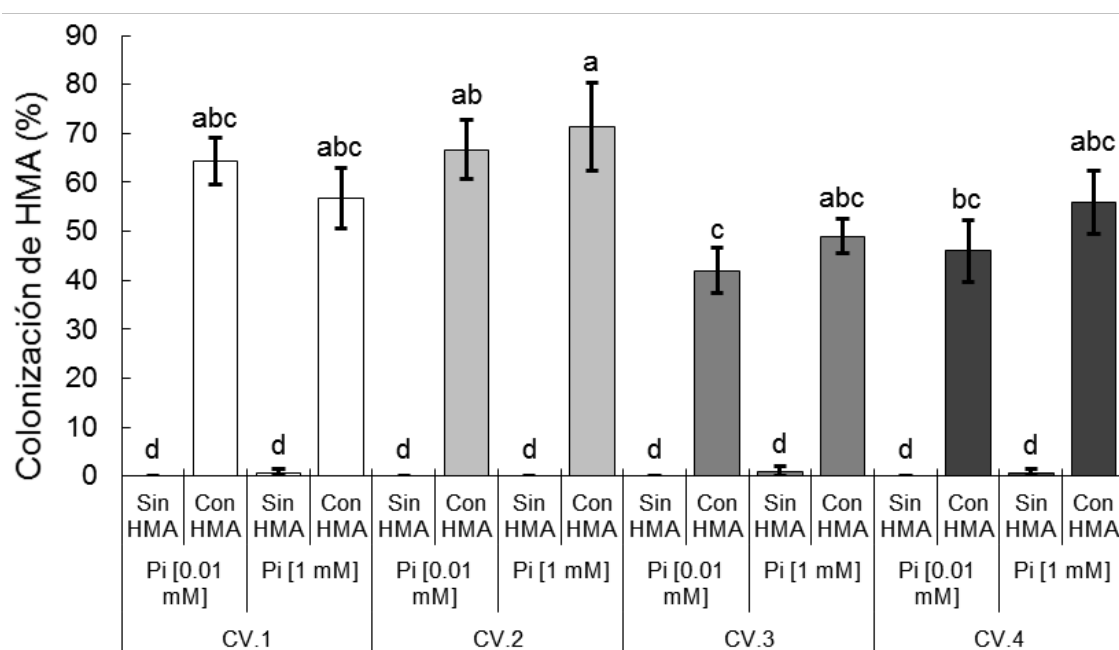


Figura 41. Colonización de HMA (%) entre los tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

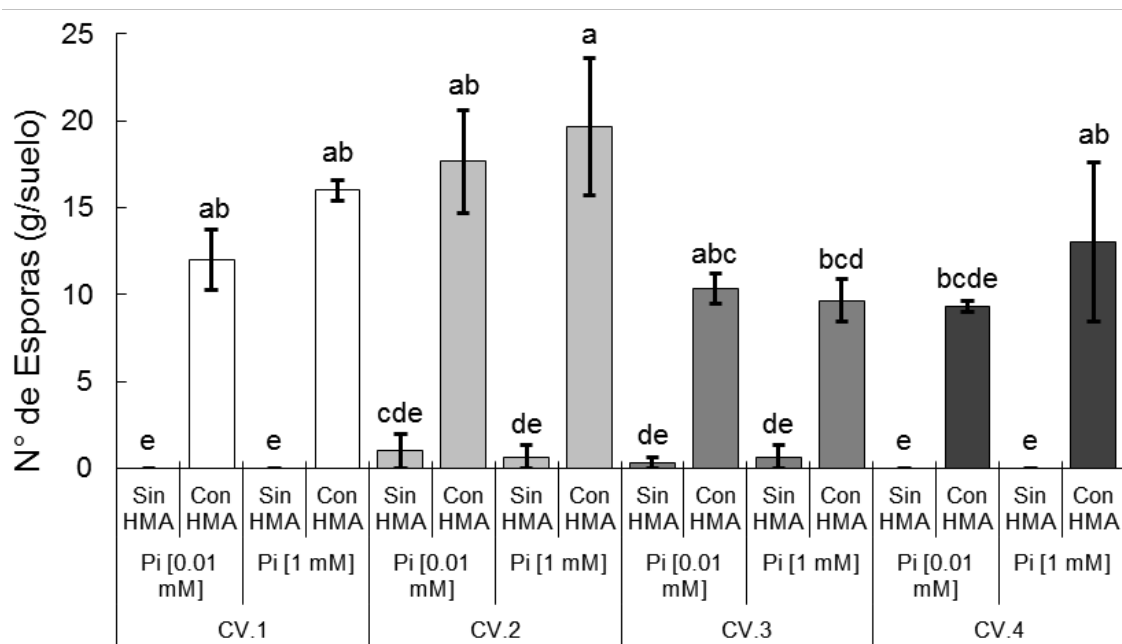


Figura 42. Nº de esporas (10 g/suelo) entre los tratamientos de cada uno de los cultivares maíz (CV.1, 2, 3 y 4). Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

7.4. Cambio en el nivel de expresión relativa de genes *Pht1*

En la Tabla IX se agrupa los resultados del análisis de varianza entre tratamientos, y que evalúan los cambios de expresión relativa (ER) de los genes *ZEAmPht1;3* y *ZEAmPht1;6* en tejido de raíces de plantas de maíz a los 75 DDT.

En el apartado A) se evaluó el cambio de expresión relativa de los genes *ZEAmPht1;3* y *ZEAmPht1;6* entre plantas de maíz desarrolladas bajo dos concentraciones de *Pi* (1 y 0.01 mM). La expresión normalizada de planta que se desarrollaron bajo la concentración 0.01 mM de *Pi* fue utilizada como calibrador (*valor 1*). Los resultados indicaron que plantas que se desarrollaron bajo la concentración 1 mM de *Pi* mostraron de manera significativa un sub-regulación en el nivel de expresión génica del gel *ZEAmPht1;3* y *ZEAmPht1;6* con 0.1130 y 0.1305 ER (respectivamente) (Fig. 43).

En el apartado B) se evaluó el cambio de expresión relativa de los genes *ZEAmPht1;3* y *ZEAmPht1;6* entre plantas de maíz desarrolladas bajo dos condiciones de HMA (con y sin). La expresión normalizada de planta que se desarrollaron sin la presencia de HMA fue utilizada como calibrador (*valor 1*). Los resultados indicaron que plantas desarrolladas con la presencia de HMA mostraron de manera significativa una sobre-regulación en el nivel de expresión génica del gel *ZEAmPht1;3* (2.3115 ER), mientras que el gen *ZEAmPht1;6* mostro sub-regulación con 0.4321 ER (Fig. 43).

En el apartado C) se evaluó el cambio de expresión relativa de los genes *ZEAmPht1;3* y *ZEAmPht1;6* entre cuatro niveles, resultado de la combinación de las dos concentraciones de *Pi* y las dos condiciones de HMA. La expresión normalizada de planta que se desarrollaron bajo la concentración 0.01 y sin HMA, fue utilizada como calibrador (*valor 1*). Los resultados mostraron de manera significativa un sub-regulación del gen *ZEAmPht1;3* que fue dependiente a la concentración 1mM de *Pi*, mientras que en plantas que se desarrollaron bajo una concentración 0.01 mM de *Pi* y la presencia de HMA, tendieron a sobre-regular el nivel de expresión en 1.1045 ER (Fig. 44). Por otro lado, el gen *ZEAmPht1;6* mostro una sub-regulación en plantas que crecieron en la concentración 1 mM de

Pi con y sin HMA, así como plantas que crecieron en una concentración 0.01 con HMA. Este último mantuvo una diferencia estadística en el nivel de sub-regulación, con relación a plantas desarrolladas bajo la concentración 1 mM y asociadas a HMA (0.4265 y 0.0658 ER) respectivamente (Fig. 44).

En el apartado D) el cambio de expresión relativa de los genes *ZEAmPht1;3* y *ZEAmPht1;6* entre 16 tratamientos, resultado de la combinación de los cuatro cultivares de maíz, las dos concentraciones de *Pi* y las dos condiciones de HMA. Para cada uno de los cultivar, se utilizó la expresión normalizada de planta que se desarrollaron bajo la concentración 0.01 y sin HMA como calibrador (*valor 1*).

Par el gen *ZEAmPht1;3*; todos los cultivares mostraron de manera significativa una sub-regulación en el nivel de expresión por la concentración 1 mM de *Pi*. De igual manera, plantas del cultivar 1 que crecieron asociadas a HMA y bajo la concentración 0.01 mM mostraron de forma significativa una sub-regulación (0.7148 ER). Por otro lado, los cultivar 2 y 3, mostraron significativamente una sobre-regulación cuando crecieron asociadas a HMA bajo la concentración de 0.01 de *Pi* (1.24 y 1.41 ER) respectivamente (Fig. 45). Para el gen *ZEAmPht1;6*; se observó una sub-regulación en plantas de los cultivares 1, 2 y 3, que crecieron en la concentración 1 mM de *Pi* con y sin HMA, así como plantas que crecieron en una concentración 0.01 con HMA, mientras que en el cultivar 4, esta sub-regulación se limitó a plantas que crecieron bajo la concentración 1 mM de *Pi* (Fig. 46).

Tabla IX. Cambio en el nivel de expresión relativa de los genes *ZEAm;Pht1;3* y *ZEAm;Pht1;6* en tejido de raíz a los 75 DDT¹.

Expresión Relativa			<i>ZEAm;Pht1;3</i>	<i>ZEAm;Pht1;6</i>
A) Concentración de Pi				
Pi [0.01 mM]			1 ± 0.0 ^a	1 ± 0.0 ^a
Pi [1 mM]			0.113046 ± 0.0118972 ^b	0.130527 ± 0.0301681 ^b
B) Condición de HMA				
Sin HMA			1 ± 0.0 ^b	1 ± 0.0 ^a
Con HMA			2.11684 ± 0.30554 ^a	0.0432127 ± 0.117287 ^b
C) Concentración de Pi * Condición de HMA				
Pi [0.01 mM]*Sin HMA			1 ± 0.0 ^a	1 ± 0.0 ^a
Pi [0.01 mM]*Con HMA			1.10452 ± 0.0776831 ^a	0.426531 ± 0.181943 ^b
Pi [1 mM]*Sin HMA			0.0957833 ± 0.0189146 ^b	0.120493 ± 0.0556033 ^{bc}
Pi [1 mM]*Con HMA			0.146476 ± 0.0211223 ^b	0.0658864 ± 0.0176869 ^c
D) Cultivar de maíz *Concentración de Pi * Condición de HMA				
CV.1	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	1 ± 0.0 ^a	1 ± 0.0 ^a
		Con HMA	0.714846 ± 0.165409 ^b	0.32246 ± 0.162957 ^b
	Pi [1 mM]	Sin HMA	0.0241256 ± 0.00507096 ^c	0.0187327 ± 0.0187327 ^c
		Con HMA	0.0687005 ± 0.0110765 ^c	0.0648056 ± 0.0213019 ^c
CV.2	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	1 ± 0.0 ^b	1 ± 0.0 ^a
		Con HMA	1.24998 ± 0.102387 ^a	0.0628896 ± 0.0377605 ^b
	Pi [1 mM]	Sin HMA	0.0878312 ± 0.00584304 ^c	0.0192406 ± 0.00873875 ^b
		Con HMA	0.107104 ± 0.0176825 ^c	0.0311104 ± 0.00526272 ^b
CV.3	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	1 ± 0.0 ^b	1 ± 0.0 ^a
		Con HMA	1.41445 ± 0.127996 ^a	0.0216719 ± 0.0143395 ^c
	Pi [1 mM]	Sin HMA	0.17791 ± 0.0632416 ^c	0.0562003 ± 0.0111654 ^b
		Con HMA	0.295432 ± 0.0372417 ^c	0.0326275 ± 0.00911284 ^{bc}
CV.4	Pi [0.01 mM]	Sin HMA	1 ± 0.0 ^a	1 ± 0.0 ^{ab}
		Con HMA	1.03879 ± 0.0462144 ^a	1.2991 ± 0.606007 ^a
	Pi [1 mM]	Sin HMA	0.0932664 ± 0.0115607 ^b	0.387798 ± 0.192606 ^{ab}
		Con HMA	0.114667 ± 0.0150696 ^b	0.135002 ± 0.061423 ^b

Notas: Análisis de varianza simple para la expresión relativa de los genes *ZEAm;Pht1;3* y *ZEAm;Pht1;6*. Cada valor corresponde a la media n= 40 (A y B), n=20 (factor C) y n= 5 (D). Las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$; La Agrupación de la información se realizó utilizando el método de (HSD) de Tukey con una confianza del 95 %. Para las interacciones los valores-P menores a 0.05 (*) prueban un efecto estadístico entre los factores. ¹ Días Después del Trasplante.

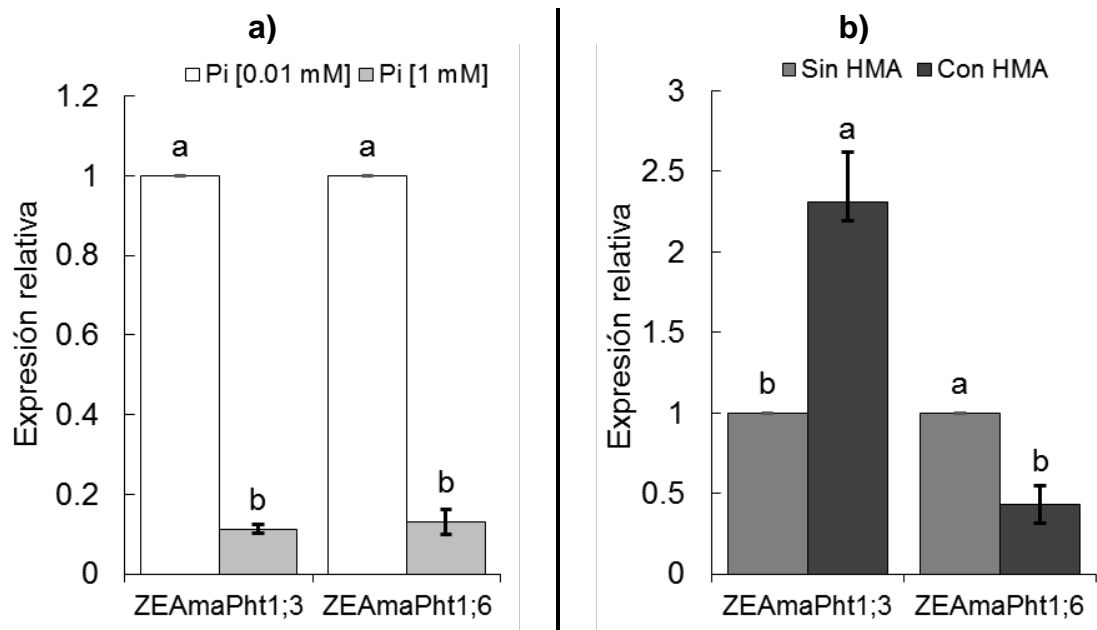


Figura 43. Cambio de expresión relativa del gen *ZEAma;Pht1;3* y *ZEAma;Pht1;6*, para: a) concentración de *Pi* y b) condición de HMA. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Las medias que comparten una letra (a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

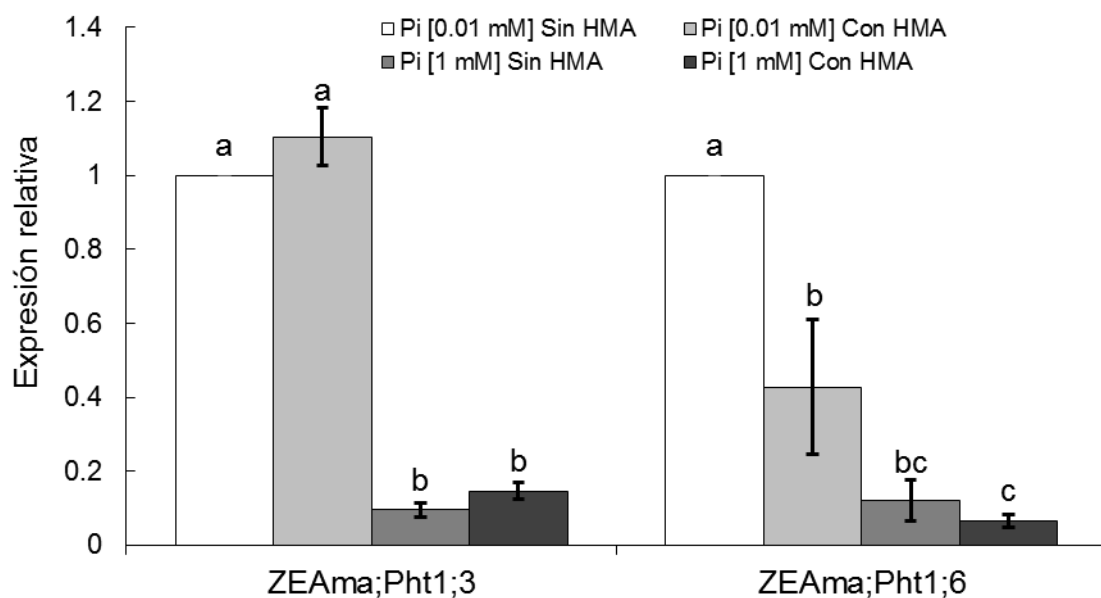


Figura 44. En tratamientos se indica el cambio de expresión relativa del gen *ZEAma;Pht1;3* y *ZEAma;Pht1;6*. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Las medias que comparten una letra (a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

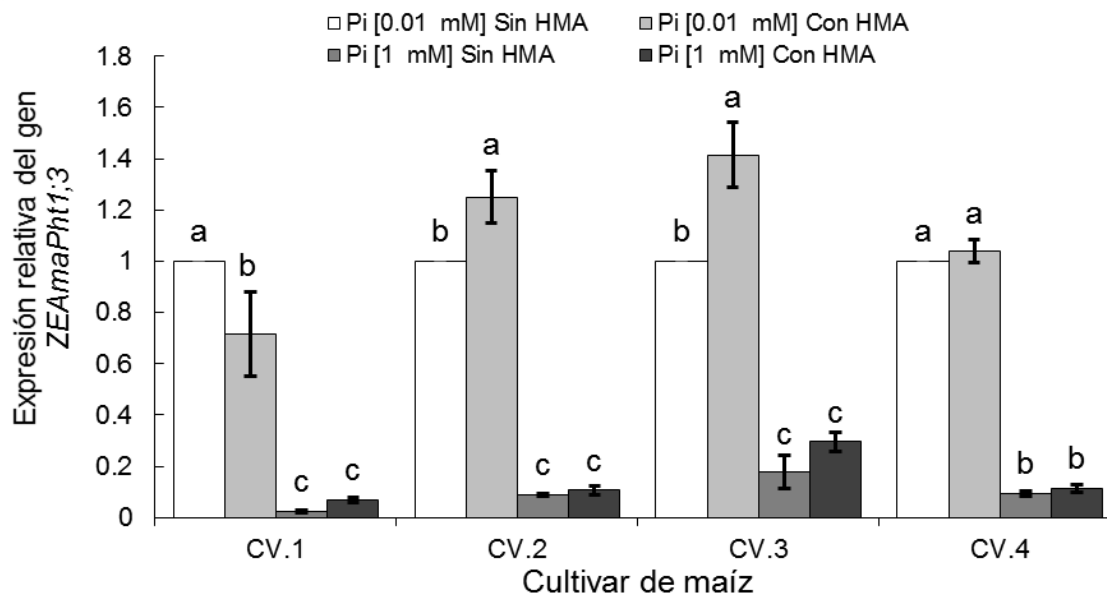


Figura 45. Cambio de expresión relativa del gen *ZEAma;Pht1;3* entre tratamientos de cada uno de los cultivares de maíz. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

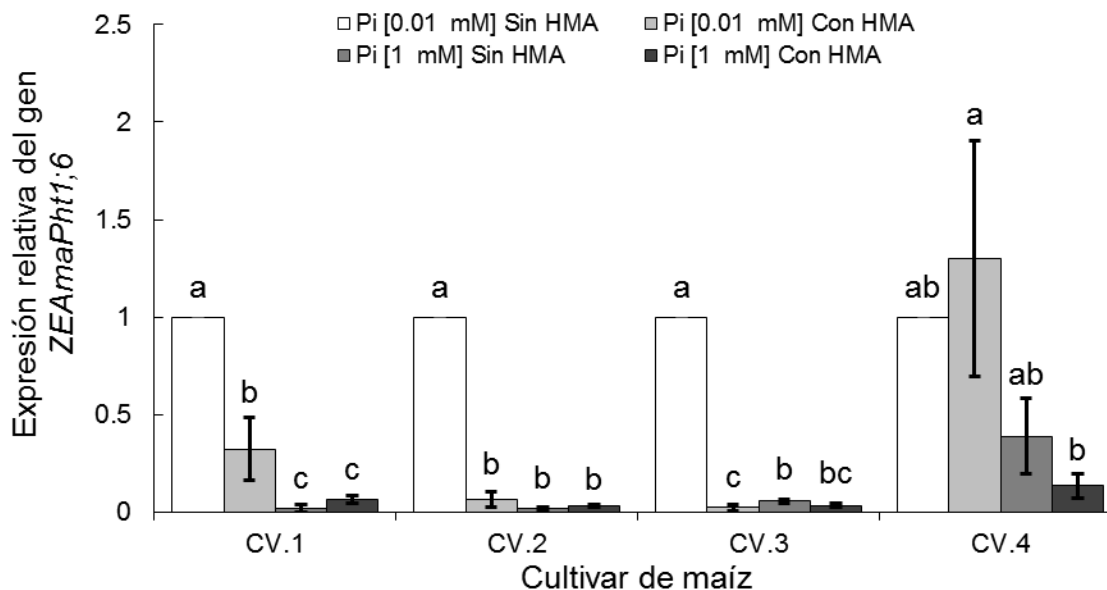


Figura 46. Cambio de expresión relativa del gen *ZEAma;Pht1;6* entre tratamientos de cada uno de los cultivares de maíz. Las barras sobre las columnas indican el error estándar. Entre los tratamientos de cada cultivar, las medias que comparten una letra (^a) son iguales estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla X. Análisis de correlación por rangos de Serman entre variables microbiológicas, morfométricas, fisiológicas y de expresión de genes.

	% Col.	N° Esp.	A.P.	A.H.	L.R.	P.S.T.	P.S.H.	P.S.R.	B.S.A.	B.S.T.	SPAD	C.T.	P.H.F.	A	gs	E	Ci.	<i>Pht1:3</i>	<i>Pht1:6</i>
% Col. ¹		0.86*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.31*	NS
N° Esp. ²	0.86*		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.29*	NS	NS	NS	NS	0.34*	NS
A.P. ³	NS	NS		-0.25*	NS	0.38*	-0.27*	-0.32*	0.31*	NS	0.46*	0.29*	NS	0.30*	0.27*	0.39*	NS	NS	NS
A.H. ⁴	NS	NS	-0.25*		NS	0.27*	0.81*	0.39*	0.33*	0.54*	NS	NS	NS	-0.36*	-0.38*	-0.35*	-0.32*	NS	NS
L.R. ⁵	NS	NS	NS	NS		NS	NS	-0.49*	NS	-0.29*	0.24*	0.28*	NS	NS	NS	NS	NS	-0.39*	NS
P.S.T. ⁶	NS	NS	0.38*	0.27*	NS		NS	NS	0.93*	0.60*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P.S.H. ⁷	NS	NS	-0.27*	0.81*	NS	0.44*		0.47*	0.55*	0.72*	NS	NS	NS	-0.39*	-0.40*	-0.38*	-0.25*	NS	NS
P.S.R. ⁸	NS	NS	-0.32*	0.39*	-0.49*	NS	0.47*		NS	0.81*	NS	NS	-0.26*	NS	NS	-0.25*	NS	NS	NS
B.S.A. ⁹	NS	NS	0.31*	0.33*	NS	0.93*	0.55*	NS		0.60*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B.S.T. ¹⁰	NS	NS	NS	0.54*	-0.29*	0.60*	0.72*	0.81*	0.60*		NS	NS	NS	-0.29*	-0.28*	-0.30*	NS	NS	NS
SPAD ¹¹	NS	NS	0.46*	NS	0.24*	NS	NS	NS	NS	NS		0.39*	NS	NS	NS	NS	NS	-0.46*	NS
C.T. ¹²	NS	NS	0.29*	NS	0.28*	NS	NS	NS	NS	NS	0.39*		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P.H.F. ¹³	NS	-0.29*	NS	NS	NS	NS	NS	-0.26*	NS	NS	NS	NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS
A ¹⁴	NS	NS	0.30*	-0.36*	NS	NS	-0.39*	NS	NS	-0.29*	NS	NS	NS		0.99*	0.97*	0.25*	NS	NS
gs ¹⁵	NS	NS	0.27*	-0.38*	NS	NS	-0.40*	NS	NS	-0.28*	NS	NS	NS	0.99*		0.96*	0.36*	NS	NS
E ¹⁶	NS	NS	0.39*	-0.35*	NS	NS	-0.38*	-0.25*	NS	-0.30*	NS	NS	NS	0.97*	0.96*		NS	NS	NS
Ci. ¹⁷	NS	NS	NS	-0.32*	NS	NS	-0.25*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.25*	0.36*	NS		NS	NS
<i>Pht1:3</i> ¹⁸	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		0.34*
<i>Pht1:6</i> ¹⁹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.34*	

Notas: El rango de los coeficientes de correlación va de -1 a +1, y miden la fuerza de la asociación entre las variables. Valores-*P* abajo de 0.05 (*) indican correlaciones significativamente diferentes de cero, con un nivel de confianza del 95 %. ¹ Porcentaje de Colonización; ² N° de Esporas; ³ Altura de planta (cm); ⁴ Área de hoja (cm²); ⁵ Longitud de raíz (cm); ⁶ Peso seco de tallos (g); ⁷ Peso seco de hojas (g); ⁸ Peso seco de raíz (g); ⁹ Biomasa seca aérea (g); ¹⁰ Biomasa seca total (g); ¹¹ Índice de verdor (U. SPAD); ¹² Clorofila total (µg L⁻¹); ¹³ Potencial hídrico foliar (ψ -Mpa); ¹⁴Tasa fotosintética (µmol CO₂m⁻²s⁻¹); ¹⁵Conductancia estomática (mol H₂O m⁻²s⁻¹); ¹⁶Tasa transpiratoria (mmol H₂O m⁻²s⁻¹); ¹⁷ Carbono intercelular (µmolCO₂mol⁻¹); ¹⁸ Cambio en el nivel expresión del gen *ZEAmPht1;3*; ¹⁹ Cambio en el nivel expresión del gen *ZEAmPht1;6*.

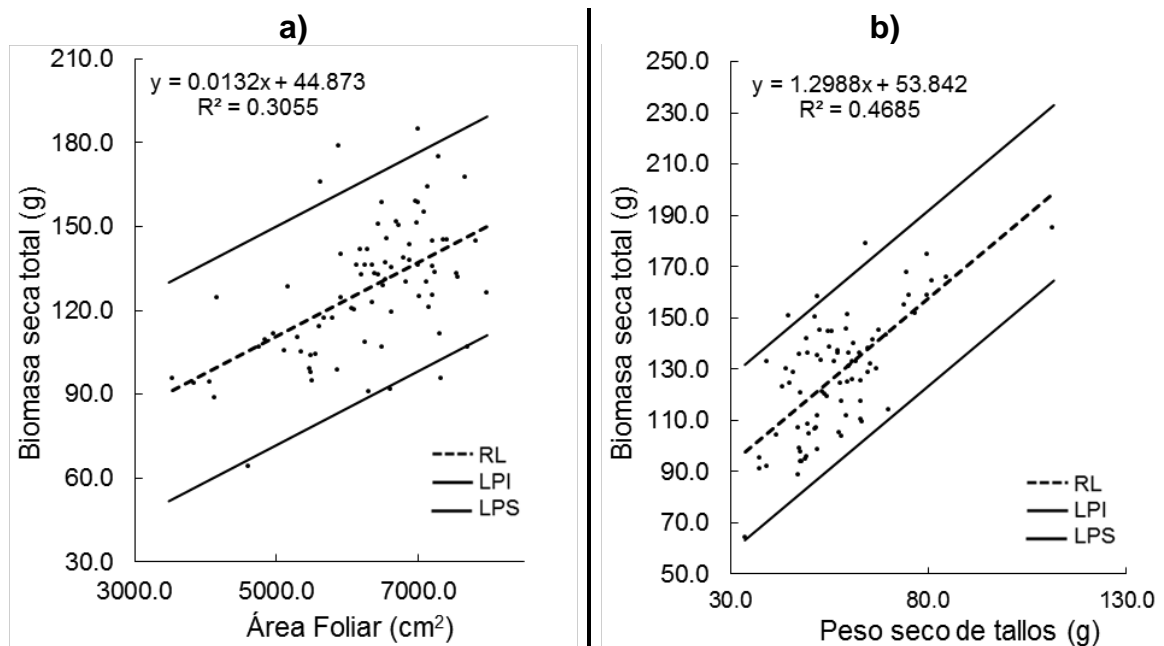


Figura 47. Modelo lineal ajustado entre las variables: a) biomasa seca total (g) y área de hojas (cm²); b) biomasa seca total (g) y peso seco de tallos (g). RL (regresión lineal) LPI (límite de predicción inferior) y LPS (límite de predicción superior).

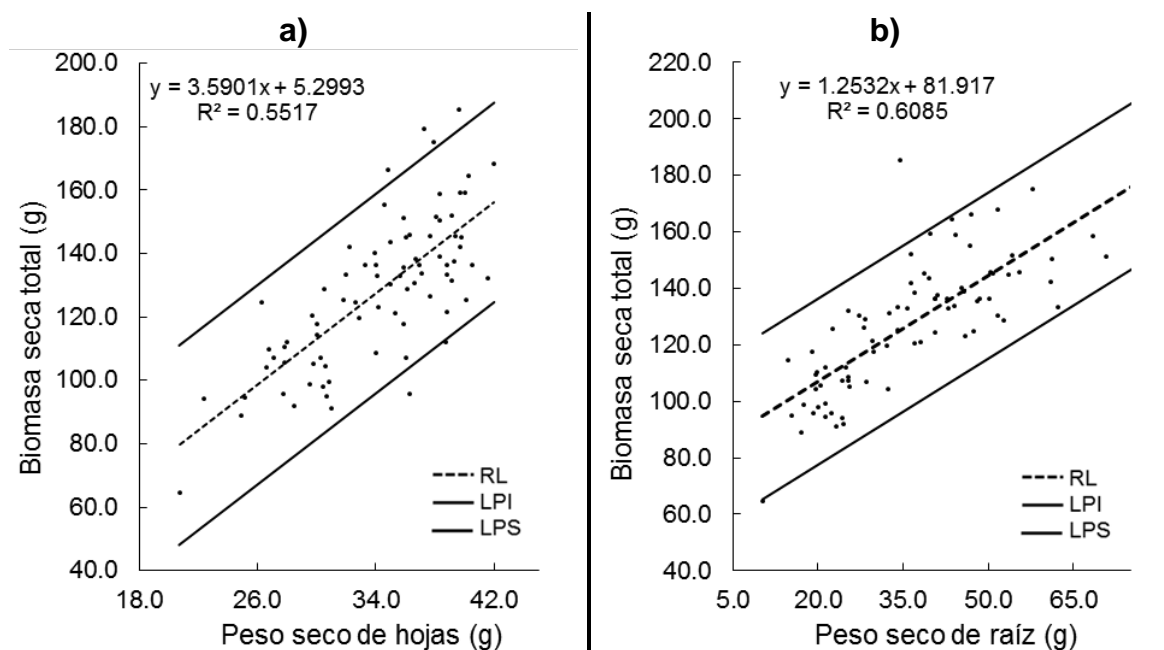


Figura 48. Modelo lineal ajustado entre las variables: a) biomasa seca total (g) y peso seco de hojas (g); b) biomasa seca total (g) y peso seco de raíz (g). RL (regresión lineal); LPI (límite de predicción inferior); LPS (límite de predicción superior).

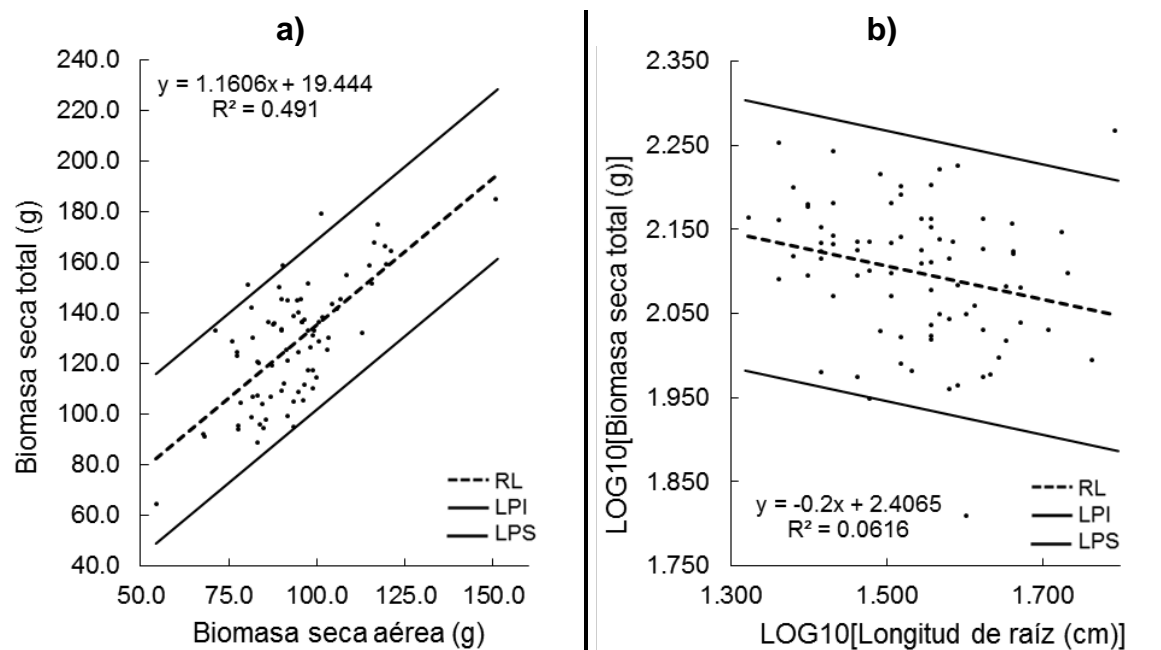


Figura 49. Modelo lineal ajustado entre las variables: a) biomasa seca total (g) y biomasa seca aérea (g); b) LOG_{10} [Biomasa seca total (g)] y LOG_{10} [Longitud de raíz (cm)]. RL (regresión lineal); LPI (límite de predicción inferior); LPS (límite de predicción superior).

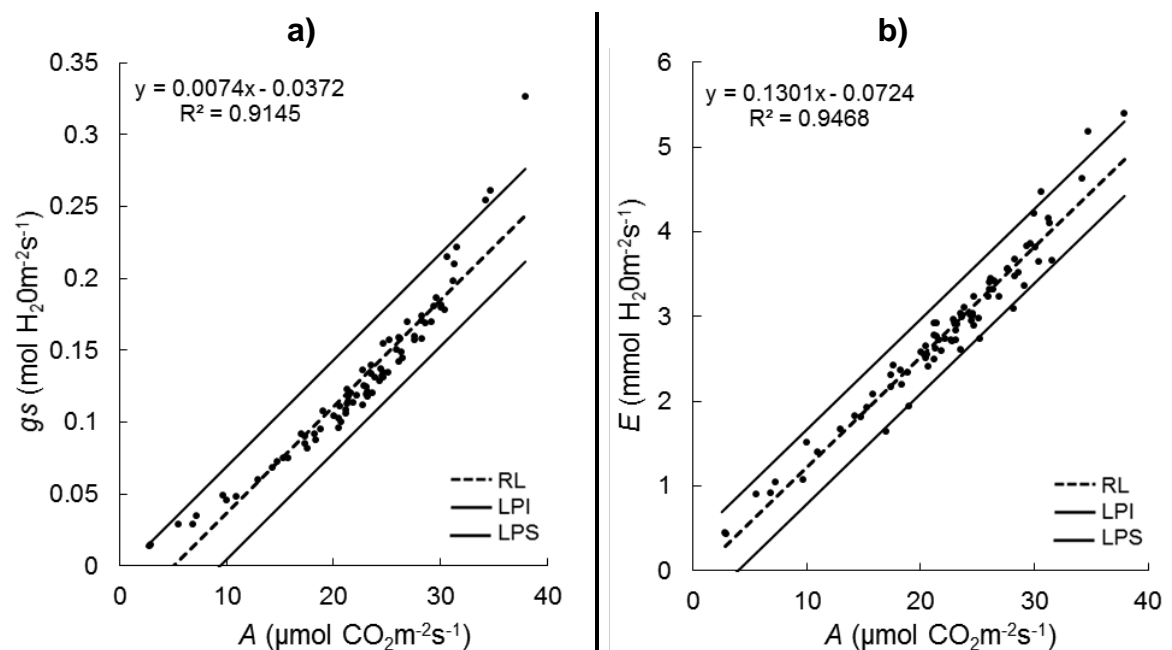


Figura 50. Modelo lineal ajustado entre las variables: a) conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); b) tasa transpiratoria ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y tasa fotosintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). RL (regresión lineal); LPI (límite de predicción inferior); LPS (límite de predicción superior).

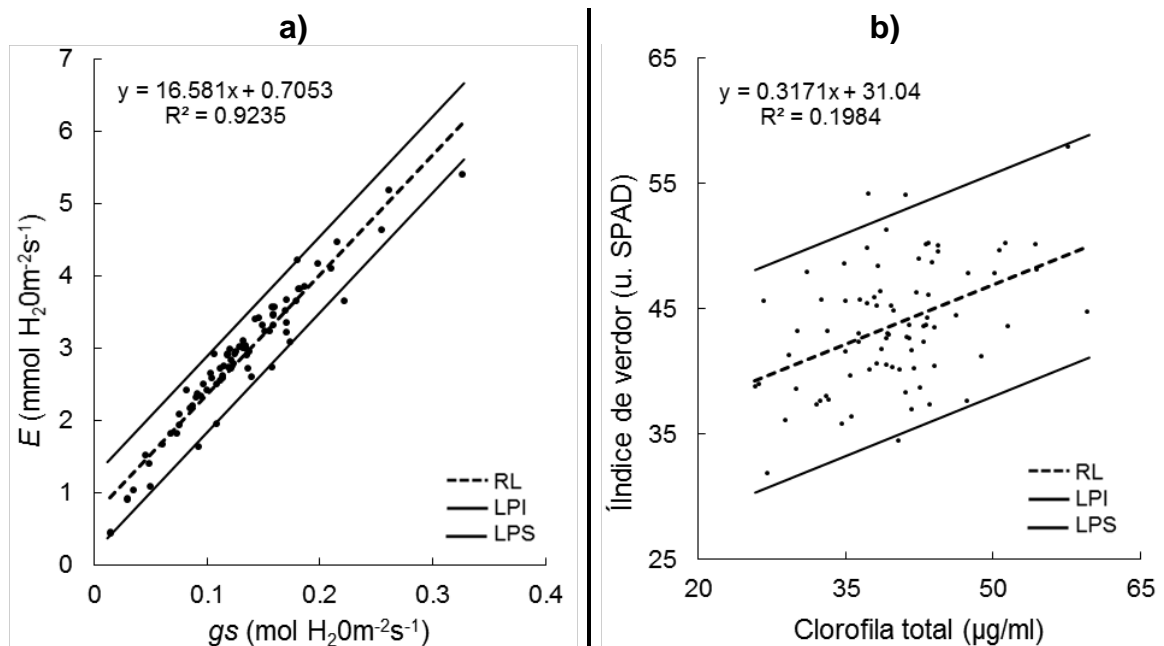


Figura 51. Modelo lineal ajustado entre las variables: a) tasa transpiratoria ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$); b) índice de verdor (U.SPAD) y clorofila total ($\mu\text{g mL}^{-1}$). RL (regresión lineal); LPI (límite de predicción inferior); LPS (límite de predicción superior).

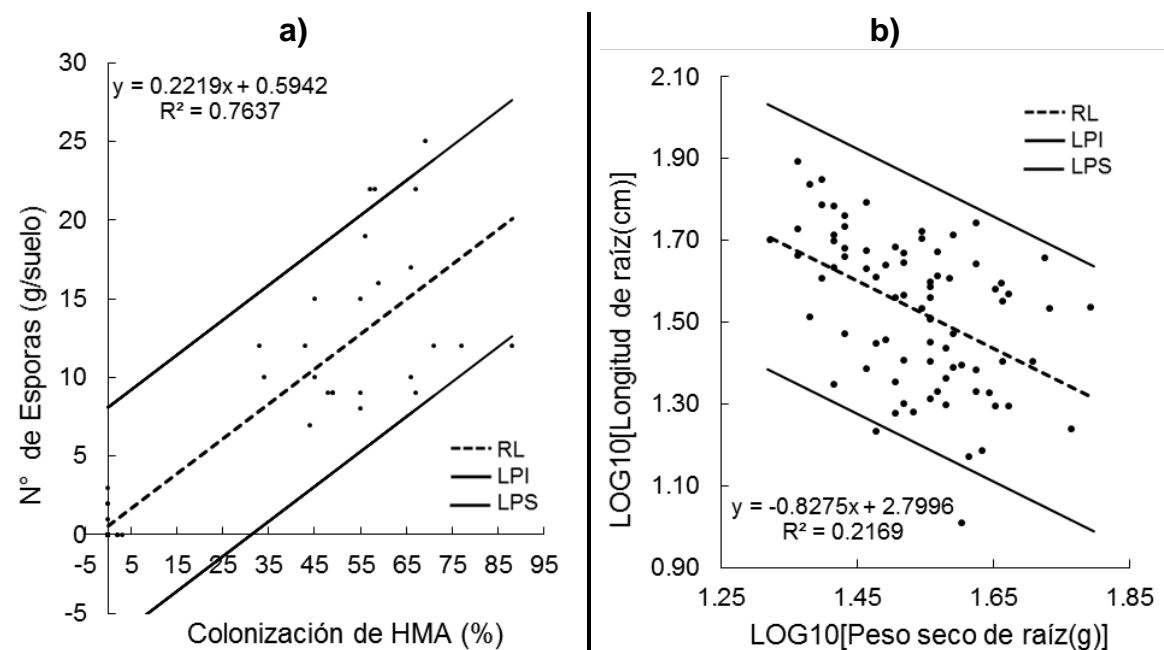


Figura 52. Modelo lineal ajustado entre las variables: a) número de esporas (10 g/suelo) y colonización de HMA (%); b) LOG_{10} [Longitud de raíz (cm)] y LOG_{10} [Peso seco de raíz (g)]. RL (regresión lineal); LPI (límite de predicción inferior); LPS (límite de predicción superior).

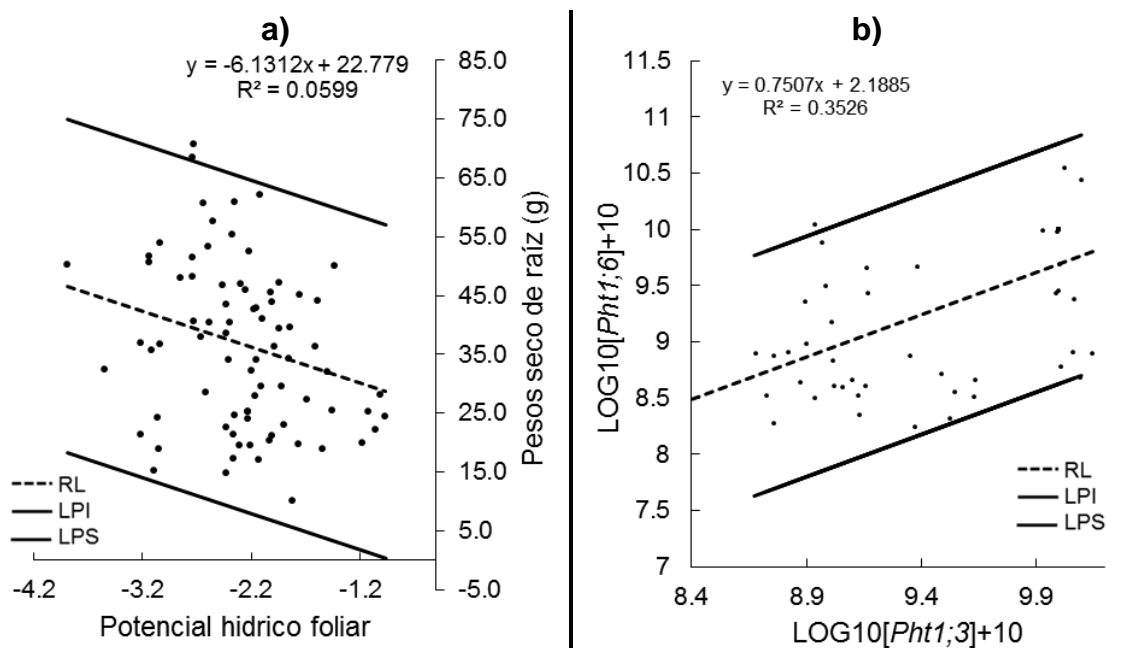


Figura 53. Modelo lineal ajustado entre las variables: a) potencial hídrico foliar (-Mpa) y peso seco de raíz (g); b) $\text{LOG}_{10}[\text{Pht1};6]+10$ y $\text{LOG}_{10}[\text{Pht1};3]+10$. RL (regresión lineal); LPI (límite de predicción inferior); LPS (límite de predicción superior).

8. DISCUSIÓN

Plantas de maíz inoculadas con *C. etunicatum*, presentaron altos porcentajes (%) de colonización en raíces y un alto N° de esporas en comparación con plantas que crecieron sin HMA. De acuerdo con Ortas y Akpinar (2011) diferentes especies de HMA entre ellas *C. etunicatum* (antes denominado *Glomus etunicatum*) han mostrado una alta afinidad a la colonización de raíces y producción de esporas en diferentes genotipos de maíz. En este trabajo, se observó la interacción entre los factores de *Pi* y de HMA sobre estas variables microbiológicas, donde, altas concentración de *Pi* en suelo redujeron significativamente los % de colonización y N° de esporas raíces. Ortas (2003) indicó que un incremento gradual en las concentraciones de P en los suelos (0, 25 y 125 mg P kg⁻¹) redujo progresivamente la colonización de tres especies de HMA (*G. etunicatum*, *G. caledonium* y *G. mosseae*) en raíces de plantas de maíz. Por otro lado, resultados de Hao *et al.* (2008), mostraron sobre dos líneas endogámicas de maíz que la tasa de colonización de dos especies de HMA (*G. mosseae* y *G. etunicatum*) disminuyó marcadamente en niveles intermedio y alto de fósforo en el suelo (50 y 100 mg P kg⁻¹, respectivamente), en comparación con los obtenidos en un nivel bajo (10 mg P kg⁻¹).

Una de las teorías que da explicación a la reducción en la colonización por altas concentraciones de fósforo en suelos asume que plantas que se suministran con un nivel óptimo de *Pi* disminuyen la entrega de carbono al hongo hospedero y en su lugar siguen adquiriendo *Pi* a través de la vía de absorción directa desde la epidermis de la raíz (Javot *et al.*, 2007), probablemente como resultado de la capacidad de las plantas para mantener la homeostasis celular mediante el equilibrio dinámico de su sistema.

Sangabriel-Conde *et al.* (2014) han indicado que los porcentajes de colonización de HMA no mostraron diferencias significativas en cuatro de cinco cultivares de maíz evaluados en dos niveles de disponibilidad de fósforo en suelo (5 y 65 mg P kg⁻¹). Generalmente las variaciones en la respuesta de colonización están

asociadas a las diferentes características de genotipos de plantas y hongos involucrados, y el ambiente en el que interactuaran (Feddermann *et al.*, 2010; Ramaekers *et al.*, 2010), los cuales de acuerdo con Ortas y Akpinar (2011) pueden dar como resultado distintos niveles de respuesta de colonización y crecimiento. Hao *et al.* (2008) indicaron que las tasas de colonización de HMA entre dos líneas endogámicas de maíz (*Hc* y 178) difirieron significativamente bajo tres distintas concentraciones de P_i en suelo (10, 50 y 100 mg kg⁻¹), particularmente las mayores tasas de colonización fueron de la línea *Hc*, un genotipo catalogado deficiente en la absorción en comparación a la línea 178 eficiente en la absorción de fósforo.

Con relación a la asociación simbiótica entre plantas y HMA, revisiones de Bonfante *et al.* (2015) han indicado que la capacidad de plantas mico-tróficas para relacionarse con los HMA genera un impacto positivo sobre el crecimiento vegetal debido a un incremento en la absorción de nutrientes del suelo que son facilitados por la red de micelio de estos hongos endófitos. Además, las hifas de los HMA incrementan la capacidad de mineralización y absorción de P orgánico e inducen una mayor secreción de fosfatasas ácidas de las plantas en condiciones deficientes de P (Javot *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2011).

En este estudio se observó que plantas de maíz inoculadas con HMA mantuvieron un incremento significativo en la respuesta de crecimiento vegetal con relación a las plantas sin HMA independientemente de las concentraciones de P_i y el cultivar de maíz. Resultados similares han sido reportados por Sangabriel-Conde *et al.* (2014), donde mencionan que la presencia de HMA incremento los índices de biomasa seca total de plantas maíz en relación a plantas sin estos hongos.

Por su parte Hao *et al.* (2014) indicaron que el promedio del área de hojas de plantas de maíz asociadas a *G. mosseae* incrementó un 21.9 % en relación a plantas sin estos microorganismos, mientras que la inoculación de cuatro especies de HMA (*G. deserticola*, *G. intraradices*, *G. mosseae* y *Gigaspora gigantea*), incrementaron significativamente el peso seco de brotes (Tian *et al.*, 2013).

Por otro lado, Zhu *et al.* (2005) han indicado que los HMA alteran la arquitectura de la raíz en plantas de maíz, particularmente en suelos bajamente fertilizados, específicamente incrementan la ramificación, morfología y topología de la raíz en el suelo. Bonfante *et al.* (2015) mencionan que la mejora en el estado físico de plantas asociadas con HMA provee una ventaja ecológica en relación a plantas sin estos microorganismos (por ejemplo; nutrición mineral, defensa de patógenos de la raíz, mitigación de las condiciones de estrés ambiental o inducción de resistencia).

Sin embargo, la respuesta diferencial entre las combinaciones de especies de HMA y plantas hospederas ha sido poco estudiada, de acuerdo con Feddermann *et al.* (2010) los HMA tienen diferentes impactos sobre la morfología, estado nutricional, la eficiencia simbiótica y los patrones de expresión génica en las plantas. Sangabriel-Conde *et al.* (2014) indican diferentes grados de dependencia entre cinco variedades maíz y consorcios de HMA que crecieron bajo concentraciones altas y limitantes de P_i . Por otro lado, Ortas y Akpinar (2011) indicaron grados de dependencia entre seis cultivares de maíz inoculados con distintas especies de HMA.

En estudios controlados se ha indicado que los costos de respiración por parte de los HMA son considerables, consumiendo entre el 7 al 12 % de la fotosíntesis fijada diariamente (Bryla y Eissenstat, 2005), siendo los beneficios de la simbiosis para las plantas útiles sólo cuando el fósforo en lugar de carbono es el principal factor limitante para el crecimiento (Zhu *et al.*, 2005). La falta de respuesta de crecimiento por parte de los HMA es causada por los costos netos de carbono (C) impuestos por el hongo para mantener la simbiosis, los cuales sobrepasan los beneficios netos en nutrición mineral.

Sin embargo, de acuerdo con Smith *et al.* (2011) esta teoría debe ser replanteada desde el punto de vista del funcionamiento de la simbiosis y sus ventajas evolutivas como; los niveles de señalización y control molecular implicados en la interacción entre hongos y procesos de las plantas, así como la competencia por los recursos en el suelo. Bryla y Eissenstat (2005) indican que las variaciones en

cuanto al costo de C están en función de las especies de plantas huéspedes y hongos hospederos involucrados, la etapa de colonización, y condiciones ambientales. Las variaciones en la respuesta al crecimiento de plantas de maíz asociadas a HMA en este estudio y los reportados previamente son atribuidas concretamente a variaciones genética, fisiológicas y de adaptación que mantienen cada uno de los cultivares durante su interacción con estos hongos y las distintas condiciones nutrimentales sobre la que se desarrollaron, estos factores se discutirán con más detalle en los apartados posteriores.

Con relación a la respuesta de crecimiento vegetal por concentraciones de P_i , en este estudio nosotros comprobamos que plantas de maíz que se desarrollaron en una concentración 1 vs 0.01 mM de P_i incrementaron significativamente variables de crecimiento vegetal como el área de hojas (cm^2), la longitud de raíz (cm) y contenido de biomasa seca total (g) independientemente del estatus de colonización micorrízica y el cultivar de maíz.

Resultados parecidos a los de Tian *et al.* (2013) donde indican que plantas de maíz desarrolladas en concentraciones 1 mM de P_i (KH_2PO_4) incrementaron el contenido de biomasa seca de brotes en relación a plantas con ausencia de P_i , así mismo, Ortas (2003) menciona que la limitación del suministro de P en suelo disminuyó significativamente la acumulación de biomasa seca en brotes en plantas de maíz.

Si bien dicha tendencia en la respuesta al crecimiento es predecible por el papel fundamental que representa el P en el desarrollo de plantas esta no está exenta de diferir entre distintos cultivares de maíz. Hao *et al.* (2008) mencionan que el peso seco de raíz de dos líneas endogámicas de maíz se vio afectado significativamente por los niveles de concentración de P con las que fueron fertilizadas. Ceasar *et al.* (2014) indican que plantas de maíz cultivadas en condiciones deficientes de P_i (10 mM) produjeron brotes de raíces cortos con un mayor número de pelos radiculares, en comparación con las cultivadas bajo condiciones suficientes de P_i (300 mM) las cuales fueron más largas, pero con menos raíces laterales.

De acuerdo con Smith *et al.* (2011), las plantas poseen diferentes mecanismos de adaptación para la nutrición de P en suelos, entre las que se incluye modificar el crecimiento y arquitectura de la raíz. Esto último guarda relación con nuestros resultados, donde existió una correlación negativa entre las variables longitud de raíz y peso seco de raíz, lo cual probablemente podría formar parte de un mecanismo de adaptación de las plantas maíz a condiciones de bajos niveles de fósforo en suelo, que las lleva a incrementar la longitud de su raíz para buscar una mayor absorción de nutrientes en el suelo a costas de reducir la biomasa de esta.

Reportes similares de Zhu *et al.* (2005) indicaron que genotipos de maíz que desplegaron sistemas de raíces poco profundas y de mayor longitud lateral, se adaptaron mejor a ambientes bajos de fósforo en relación aquellos genotipos de raíces profundas y largas. En este estudio las variaciones de crecimiento observado entre cultivares podrían estar relacionados con la presencia de genotipos eficientes o no en la absorción de P_i (ejemplo: Cv.3).

Durante este estudio se observaron diferentes niveles de respuesta al crecimiento vegetal entre cultivares de maíz, independientemente del estatus de colonización de HMA y la concentración de P_i en la que se desarrollaron. Por ejemplo, la media de las variables de área de hojas y la acumulación de biomasa seca raíz, hojas y total, de los cultivares 1, 2 y 3 fue similar entre sí, y todos significativamente superiores a la del cultivar 4, sin embargo, esta tendencia no se mantuvo en las variables de longitud de raíz y peso seco de tallos y biomasa aérea, donde solamente el cultivar 2 fue quien mantuvo el mayor incremento con relación a las medias del cultivar 4. De acuerdo con Kaepler *et al.* (2000) los patrones de crecimiento de maíz en condiciones limitantes de fósforo son afectados por factores fisiológicos o bien por su interacción con microorganismos del suelo. Nuestros resultados mostraron que plantas de los cultivares 3 y 4 mantuvieron una mayor variación en la respuesta de crecimiento en variables como área foliar y biomasa seca total cuando crecieron bajo las distintas combinaciones de tratamientos como resultado de la interacción entre los factores concentración de P_i y condición de HMA, mientras que en plantas de los cultivares 1 y 2 el efecto de la interacción de

alguno de estos dos factores sobre la respuesta de crecimiento no fue tan pronunciado.

Por otro lado, plantas de los cultivares 1 y 4 mostraron una mayor variación en la respuesta de crecimiento sobre la variable de longitud de raíz entre las diferentes combinaciones de tratamientos en comparación con plantas de los cultivares 2 y 3, particularmente los tratamientos que consideraba la concentración 0.01 mM de P_i en los cultivares 1 y 4, tendieron a disminuir significativamente la media de esta variable. Investigaciones de los últimos años han reportado de manera similar diferentes niveles de respuestas de crecimiento entre distintos genotipos de maíz (Sangabriel-Conde *et al.*, 2014; Ortas y Akpinar, 2011; Hao *et al.*, 2008; Kaeppler *et al.*, 2000).

La respuesta fenotípica entre cultivares de maíz y la forma inherente de interactuar con su ambiente, dan como resultado las variaciones en los patrones de crecimiento reportados aquí y en estudios previos. Por ejemplo, investigaciones de Zhu *et al.* (2005) indicaron que diferentes genotipos de maíz mostraron modular de diferentes maneras la arquitectura de su raíz en el suelo con el fin de mejorar la absorción de nutrientes en condiciones limitantes y durante las simbiosis con HMA, o de acuerdo con Kaeppler *et al.* (2000) esto varían sustancialmente la respuesta a la colonización micorrízica entre diferentes líneas de maíz.

Durante la colonización de HMA diversos factores han demostrado influir sobre la modificación de los procesos fisiológicos de las plantas, particularmente durante condiciones estrés. Principalmente estos se han relacionado con la mejora del estatus nutrimental de las plantas, las demandas netas de carbono entre el huésped y hospedero, alteraciones en la conductividad hidráulica de la raíz en el suelo, la modificación en el intercambio gaseoso, modificaciones a nivel enzimático, cambios en los niveles hormonales y de expresión de genes (Bryla y Eissenstat, 2005; Amaya-Carpio *et al.*, 2009; Boomsma y Vyv, 2008; Zhu *et al.*, 2005, 2011; Hao *et al.*, 2014).

Con relación a los cambios en la fisiología de plantas de maíz por la colonización de HMA, durante este estudio observamos que plantas de maíz que se asociaron a *C. etunicatum* mantuvieron pocos cambios en el metabolismo vegetal, independientemente de la concentración de P_i sobre la que se desarrollaron y el cultivar de maíz. Dichos cambios se limitaron a la variable del índice de verdor, donde plantas asociadas a HMA disminuyó significativamente en un 5.3 % el verdor en relación a plantas que crecieron sin estos hongos. Los cambios en la fisiología ejercidos por HMA se puntualizaron entre los diferentes cultivares, además de diferir entre estos. Por ejemplo, en este estudio se observó que la variable de clorofila total incremento en un 14.8 %, en plantas de maíz del cultivar 1 asociadas a HMA con relación a plantas de este mismo cultivar sin la presencia de estos hongos, mientras que plantas del cultivar 2 no mostraron una dependencia a la colonización de HMA, o caso contrario tendieron a disminuir el contenido de clorofila como en los cultivares 3 y 4. Zhu *et al.* (2011) menciona que plantas de maíz asociadas a HMA mantiene una mayor concentración de pigmentos de la clorofila y carotenoides que plantas no colonizadas, mientras que Amaya-Carpio *et al.* (2009) indicaron que la colonización HMA no genero un efecto en el contenido foliar de clorofila.

De acuerdo con Boomsma y Vyv (2008) la mejora en la capacidad fotosintética de plantas de maíz, puede ser resultado del incremento en las concentraciones foliares de carbohidratos solubles y de clorofila, esto último como resultado de la modificación del metabolismo vegetal por la colonización de HMA. Hao *et al.* (2014) mencionan que la inoculación de *G. mosseae* en plantas de *Zea mays* incremento la tasa fotosintética en un 12.2 %, además, se indicó la existencia de una correlación positiva entre el índice de colonización de raíces y la tasa fotosintética, sin embargo y durante nuestro estudio, no se logró establecer una correlación de ningún tipo sobre estas variables.

Sin duda gran parte del beneficio de los HMA se encuentra en función de los costos netos de carbono que impone a la planta para mantener la simbiosis y beneficios netos de nutrición mineral (Bryla y Eissenstat, 2005), con relación a

esto Amaya-Carpio *et al.* (2009) indicaron que la actividad en raíz de fosfatasas ácidas y fosfatasas alcalinas es generalmente mayor en plantas asociadas a HMA que aquellas que no lo están, dicha actividad podría aumentar la adquisición de nutrientes de una fuente insoluble, facilitando así la adquisición de P, el aumento de la fotosíntesis, y mejorando en forma general el crecimiento de las plantas.

Con relación a la variable potencial hídrico foliar, se observó que plantas del cultivar 3 que crecieron en presencia de *C. etunicatum* disminuyeron en un 24.7 % esta variable con relación a plantas que crecieron en la ausencia de estos hongos, mientras que plantas de los cultivares 1, 2 y 4 no mostraron un efecto significativo entre los tratamientos de HMA. Boomsma y Vyv (2008) han indicado que HMA induce cambio en las relaciones de agua de las plantas a partir de múltiples mecanismos, centrados principalmente en el impacto de la colonización de HMA sobre las tasas de absorción de agua, alteraciones de los parámetros de intercambio de gases de plantas y posteriormente, la hidratación global de la hoja.

El rango y la forma en la que estos mecanismos se modifican son variados, por ejemplo, Zhu *et al.* (2011) indicaron de manera general que plantas de maíz asociadas a HMA mantuvieron un mayor contenido relativo de agua en hojas en relación a plantas sin estos hongos, por otro lado, Auge *et al.* (2001) han indicado que HMA pueden afectar el balance hídrico de sus plantas huésped tanto en condiciones óptimas como deficientes de riego.

Una de las hipótesis que podría explicar la reducción en el potencial hídrico de hojas lo indica Boomsma y Vyv (2008) mencionando que los sistemas de raíces de plantas micorrizadas a menudo secan los suelos más rápido y más a fondo que los sistemas de raíces de plantas no micorrizadas, probablemente resultado de una mayor área de superficie de evaporación (es decir, mayor biomasa por encima del suelo) o sistemas de raíces más amplias presentes en plantas con HMA en relación a plantas sin-HMA. Esto último guarda cierta relación con nuestro análisis de regresión lineal entre las variables de peso seco de raíz contra el potencial hídrico foliar, en donde se estableció una correlación negativa entre las variables,

es decir una mayor cantidad de raíces generó una reducción en el potencial de agua de las hojas.

Durante este estudio se observaron pocos cambios en la fisiología vegetal de plantas de maíz por la concentración de P_i en la que se desarrollaron, independientemente del estatus de colonización micorrízica y el cultivar de maíz. Dichos cambios nuevamente se limitaron a la variable del índice de verdor, en donde plantas de maíz que se desarrollaron en una concentración 1 mM vs 0.01 mM de P_i incrementaron significativamente en un 7.5 % el índice de verdor. Los cambios en la fisiología ejercidos por la concentración de P_i se puntualizaron entre los diferentes cultivares, además de diferir entre estos. Particularmente en la variable de clorofila total, se observó un incremento significativo del 26.2 % del contenido de clorofila total en plantas del cultivar 1 que crecieron bajo una concentración de 1 mM de v/s 0.01 mM de P_i .

De acuerdo con Augé *et al.* (2016) plantas mejor nutridas pueden presentar procesos fisiológicos más robustos, particularmente durante condiciones de estrés. Si bien esto guarda relación con nuestros resultados, estos difieren con lo observado en plantas de los cultivares 2 y 3 las cuales no mostraron una dependencia significativa en el contenido de clorofila las dos condiciones de P_i , o mostraron como en el cultivar 4, una disminución significativa de hasta el 17.5 % del contenido de clorofila cuando crecieron en una concentración 1 mM v/s 0.01 mM P_i .

Estos resultados muestran la existencia de una respuesta diferencial del metabolismo de la clorofila entre cultivares bajo concentraciones de P_i . Resultados similares han sido reportados por Zhu *et al.* (2005) donde la evaluación de la asimilación de carbono bajo condiciones deficientes de fósforo, difirió entre cuatro cultivares de maíz, particularmente dos genotipos clasificados como eficientes en fósforo mantuvieron una mejora en la asimilación de carbono.

Con relación al potencial hídrico foliar, se observó un incremento significativo del 14.87 % en plantas del cultivar 2 que crecieron bajo una concentración 1 mM v/s 1

mM de P_i . Hao *et al.* (2014) indicaron que el uso eficiente del agua en planta de maíz aumento linealmente con el aumento tasas de fósforo disponible. Por otro lado, y para las variables tasa fotosintética, conductancia estomática y tasa de transpiración (A , g_s y E), se observó una respuesta diferencial entre cultivares. Particularmente las plantas de los cultivares 1, 2 y 4, no mostraron una dependencia significativa a las concentraciones de P_i sobre la que se desarrollaron, mientras que plantas del cultivar 3 que crecieron en la concentración 0.01 mM v/s 1 mM de P_i , redujeron de manera significativa en un 29.63, 51.15 y 43.14 % la A , g_s y E respectivamente. De acuerdo con nuestros análisis de regresión lineal, estas tres variables mantuvieron una correlación positiva entre sí, lo cual podría explicar por qué el intercambio de gases en hojas (acepción de carbono intercelular) de este cultivar se modificaron con la misma magnitud.

Hao *et al.* (2014) han indicado de forma similar que la tasa de respiración y de carbono intercelular, disminuyeron cuadráticamente por el incremento en las dosis de fertilización, también han indicado y a manera de contrastante, que la tasa fotosintética aumento de manera cuadrática a diferentes tasas de fertilización. Probablemente en nuestro estudio la condición de 0.01 mM de P_i en las plantas del cultivar 3, proporcione una alta capacidad de intercambio de gases por la disminución de las resistencias de sus estomas y por el aumento de la asimilación de CO_2 y flujos de transpiración.

Durante este estudio se observó diferentes niveles de modificación fisiológica vegetal entre cultivares de maíz, independientemente del estatus de colonización de HMA y la concentración de P_i en la que se desarrollaron. Se pudo comprobar que la variabilidad genética per se de cada cultivar, genero diferentes niveles del metabolismo, particularmente sobre las variables de tasa fotosintética, conductancia estomática y tasa de transpiración.

Por ejemplo la comparación entre medias de estas tres variables en los cultivares 3 y 4 mostró diferencias significativas con el mismo patrón, en donde el cultivar 4 incremento significativamente las variables de A , g_s y E en un 31.4, 40.9 y 32.7 %

respectivamente. Wright *et al.* (2005) indicó que plantas de maíz de la variedad H511 mantuvieron un incremento significativo en la tasa de fotosíntesis en comparación con plantas de la variedad *River*.

Las variaciones del metabolismo de cada cultivar sobre las condiciones que se desarrollaron (condición de HMA y concentración de P_i) son determinantes en las diferencias fisiológicas desplegadas entre los cuatro cultivares evaluados. Esta teoría lo pudimos corroborar con el análisis de varianza entre los 16 tratamientos que componían nuestro análisis multifactorial, donde, por ejemplo se pudo observar que gran parte de la variabilidad observada en la capacidad de intercambio gaseoso del cultivar 3, es resultado de plasticidad fenotípica que tienen sus plantas para alterar su metabolismos en concentraciones deficientes y altas de P_i , mientras que la del cultivar 4 podría estar en función de la capacidad que tiene para interactuar con HMA, particularmente bajo condiciones de deficiencia de P_i .

Los análisis de regresión lineal indicaron una correlación positiva en el cambio de expresión relativa de los genes *ZEAmPht1;3* y *ZEAmPht1;6*. Por otro lado, nuestros análisis entre tratamiento de P_i indicaron una sub-regulación de estos genes cuando plantas de maíz crecieron en condiciones altas de P_i (1 mM v/s 0.01 mM). Nagy *et al.* (2006) han indicado por técnicas de cuantificación de RT-PCR semicuantitativo, una sub-regulación en el nivel de expresión del gen *ZEAmPht1;3* por el incremento gradual de P_i , si bien esto guarda bastante relación con nuestros resultados, esto no fue así para el gen *ZEAmPht1;6*, ya que sus resultados no indicaron un cambio en el nivel expresión por concertaciones altas o bajas de P_i . Probablemente esta inconsistencia se deba 1) a la diferencia entre la potencia de la técnica para cuantificar el cambio en el nivel de expresión, y 2) las variaciones de repuesta fenotípica entre los genotipos de plantas y hongos aquí evaluados.

Tian *et al.* (2013) han indicado por técnicas de RT-qPCR que la adición de bajos niveles de fósforo en suelo incremento los niveles de expresión del gen *ZEAmPht1;6*; por otro lado, los cambios en la concentración de P_i no modificaron

los niveles de expresión del gen *ZEAmPht1;3*. Ellos asumieron que las concentraciones utilizadas fueron lo suficientemente bajas para no inducir un cambio en el nivel de expresión, tal y como en su momento lo reportaron Wright *et al.* (2005) y Nagy *et al.* (2006).

Sin embargo, estos resultados difieren con lo observado en nuestro estudio donde se utilizó la misma concentración y fuente de *Pi* (1 mM, KH_2PHO_4). Deng *et al.* (2014) indicaron que concentraciones de 5 a 10 mg kg^{-1} de P generaron una regulación positiva en la expresión del gen *ZEAmPht1;3*; demostrando su alta afinidad al transporte de *Pi* en condiciones limitantes.

De acuerdo con Javot *et al.* (2007), hay dos tipos de genes transportadores *Pht1* cuya expresión puede ser inducida en raíces colonizadas por HMA: El primer grupo engloba a aquellos genes expresados estrictamente durante la simbiosis de HMA, mientras que el segundo grupo comprende a aquellos que son inducidos fuertemente por la simbiosis de HMA pero que mantienen una expresión basal en la raíz sin colonizar, o se expresan muy poco en alguna otra parte del tejido. Para esto último el gen *ZEAmPht1;6*; ha mostrado ser inducido de forma basal y con bajos niveles de expresión en brotes (Nagy *et al.*, 2006).

De acuerdo con Deng *et al.* (2014), la expresión del gen *ZEAmPht1;6* fue regulada en un rango de 10 a 3.2 mg kg^{-1} de P, durante la etapa de crecimiento inicial en la cual el crecimiento de las raíces y el desarrollo es relativamente pobre, por lo que la necesidad de fósforo en las plantas es alta y se apoyan fuertemente de la asociación con micorrizas para mejorar su nutrición. Con base en esta hipótesis los resultados de nuestro estudio podrían indicarnos que plantas de maíz de 75 DDT, podría estar regulando la expresión de este transportador, sin embargo, dicho gen seguiría participando en la vía de absorción de *Pi* a través de micorrizas (MPU) en plantas con niveles deficientes de *Pi* en comparación con las que crecieron en niveles altos (0.01 v/s 1 mM).

Comprobamos una respuesta diferencial en el cambio de expresión de los genes *ZEAm;Pht1;3* y *ZEAm;Pht1;6* entre cultivares maíz y que estuvo en

función de los niveles de P_i y las condiciones de HMA sobre las que se desarrollaron. El cambio en el nivel de expresión del gen *ZEAm₁;Pht1;3* se puntualizó entre las concentraciones de fósforo en suelo, donde, la concentración 0.01 mM de P_i generó en todos los cultivares de maíz una sobre-regulación de su expresión. Probablemente un mecanismo de las células de la raíz bajo concentraciones altas de P_i en suelo, las llevaría a regular la expresión de este gen con el fin de mantener su homeostasis celular.

Plantas de los cultivares 1, 2 y 3 que crecieron bajo la concentración 0.01 mM de P_i mantuvieron una regulación del gen *ZEAm₁;Pht1;3* por la presencia de HMA, mientras que el cultivar 4 no se observó una dependencia significativa en la expresión de este gen por la presencia de HMA. Por otro lado, el cambio en el nivel de expresión del gen *ZEAm₁;Pht1;6* se puntualizó entre la combinación de las concentraciones de fósforo y la condición de HMA, donde plantas de los cultivares 1, 2 y 3 mostraron una sub-regulación en de la expresión de este gen en los tratamientos que involucraban un concentración 1 mM de P_i con y sin HMA, al igual que el tratamiento 0.01 mM de P_i con HMA. Mientras que plantas de cultivar 4 mostraron una sub-regulación en la expresión del gen *ZEAm₁;Pht1;6* solamente en los tratamientos que involucraban un concentración 1 mM de P_i con y sin HMA

Estos resultados nos indica que entre cultivares de maíz existe una variación en la capacidad que tiene para interactuar con HMA en la asimilación de P_i bajo condiciones limitantes, sobre todo en aquellos transportadores de fosfato que son regulados de manera positiva por HMA. Finalmente en dos de los cuatro cultivares de maíz, se comprobó una sobre-regulación del *ZEAm₁;Pht1;3* por la colonización de HMA, en condiciones bajas de P_i , esto en plantas de maíz a los 75 DDT.

9. CONCLUSIONES

Durante este estudio concluimos con aceptar nuestra hipótesis que especulaba la existencia de una respuesta diferencial en la morfo/fisiología y expresión de genes *Pht1* en al menos un cultivar de *Zea mays* L. asociado a HMA bajo dos concentraciones de P_i .

Lo anterior se comprobó en la respuesta diferencial expresada entre cultivares de maíz sobre las variables de morfometría como la longitud de raíz, el área y peso de hojas, y la biomasa seca total. Al igual que variables de fisiología como la concentración de clorofila total, el índice de verdor, el potencial hídrico, la tasa fotosintética, la conductancia estomática y la tasa de transpiración.

La respuesta fenotípica de cada cultivar sobre estas variables estuvieron en función de las concentraciones altas y bajas de P_i , el estatus de colonización de HMA o la interacción entre los dos factores. Particularmente los cultivares 3 y 4 mostraron una mayor plasticidad fenotípica tanto a las respuestas de crecimiento como a las de modificación fisiológica. Por otro lado, una variación en la plasticidad del genoma entre los cultivares de maíz, dio lugar regulación diferencial de los genes *ZEAm;Pht1;3* y *ZEAm;Pht1;6*, principalmente bajo condiciones deficientes de P_i y la interacción con HMA.

De manera general, plantas de maíz colonizadas por el HMA *C. etunicatum* mantuvieron a los 75 DDT un incremento en variables del crecimiento como el área y peso de hojas, a la vez de reducir hasta en un 10 % el peso seco de la raíz. Probablemente estas modificaciones forman parte de un mecanismo de promoción del crecimiento vegetal de HMA sobre maíz, y que en raíz podrían estar asociados con a una reducción del gasto energético y de carbono utilizado en el desarrollo de raíces largas, siendo durante la simbiosis sustituidos por el micelio extra-radical de HMA el cual es más eficiente en la absorción de agua y nutrientes. Por otro lado, una mayor cantidad de biomasa aérea podría estar ligado a una respuesta de las

plantas por aumentar la capacidad de fotosíntesis y las síntesis de compuestos de carbono que son necesarios para mantener la simbiosis con HMA.

También, se observó que plantas de maíz que se desarrollaron bajo concentración de 1 mM v/s 0.01 mM de P_i , mantuvieron de forma general un incremento sobre las variables de crecimiento, además de mantener procesos fisiológicos más robustos. Nuestros resultados nos indicaron que niveles de fósforo 30.97 v/s 0.30 mg L⁻¹ en la solución de riego son necesarios para mejor el desarrollo del cultivo de maíz a los 75 DDT. Sin embargo, este nivel de fósforo afecta ligeramente y de forma negativa la colonización de HMA en plantas de maíz, lo cual probablemente podría o no reducir los beneficios de la simbiosis de HMA.

En conclusión, aún son necesario de más estudios dirigidos a entender los mecanismos implícitos en la regulación del crecimiento, la fisiología y la expresión de los trasportadores de fosfato *Pht1*, así como el papel que estos desempeñan en la nutrición de P_i . El entendimiento de estos procesos será de gran importancia para el establecimiento de prácticas de producción agrícola sostenibles que contemplen el uso de genotipos de plantas y HMAs eficientes en la absorción de P_i bajo condiciones limitantes, así como la generación de organismos genéticamente modificados a partir de la modificación e inserción de genes *Pht1*.

10. LITERATURA CITADA

Amaya-Carpio, L., F.T. Davies, T. Fox, C. He. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer influence photosynthesis, root phosphatase activity, nutrition, and growth of *Ipomoea carnea* ssp. *fistulosa*. *Photosynthetica*. 47(1):1-10.

Aranda, P.S., D.M. LaJoie, C.L. Jorcyk. 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 33(2):366-369.

Augé, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11(1):3-42.

Augé, R.M., H.D. Toler, A.M. Saxton. 2016. Mycorrhizal stimulation of leaf gas exchange in relation to root colonization, shoot size, leaf phosphorus and nitrogen: A quantitative analysis of the literature using meta-regression. *Front. Plant. Sci.* 7:1084.

Bio-Rad Laboratories. 2015. Manual de instrucciones, SsoFast™ EvaGreen® Supermix, Rev D. Obtenido en la Red Mundial el 01 de noviembre de 2016. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_10014647.pdf

Bonfante, P., A. Desirò. 2015. Arbuscular mycorrhizas: The lives of beneficial fungi and their plant hosts. En: Lugtenberg, B. (ed.). *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing. Switzerland. pp 235-245.

Bonfante, P., A. Genre. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1(48):1-11.

Boomsma, C.R., T.J. Vyn. 2008. Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Field Crop. Res.* 108(1):14-31.

Bryla, D.R., D.M. Eissenstat. 2005. Respiratory costs of mycorrhizal associations. En: Lambers, H. M. Ribas-Carbo. (eds.). *Plant Respiration*. Springer Netherlands. Netherlands pp 207-224.

Bucher, M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* 173(1):11-26.

Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellems, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55(4):611-622.

Calderon-Vazquez, C., E. Ibarra-Laclette, J. Caballero-Perez, L. Herrera-Estrella. 2008. Transcript profiling of *Zea mays* roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant- and species-specific levels. *J. Exp. Bot.* 59(9):2479-2497.

Ceasar, S.A., A. Hodge, A. Baker, S. A. Baldwin. 2014. Phosphate concentration and arbuscular mycorrhizal colonization influence the growth, yield and expression of twelve *PHT1* family phosphate transporters in foxtail millet (*Setaria italica*). PLoS ONE. 9(9):1-12

Cordell, D., J.O. Drangert, S. White. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. Glob. Environ. Chang. 19(2):292–305.

Deng, Y., K. Chen, W. Teng, A. Zhan, Y. Tong, G. Feng, Z. Cui, F. Zhang, X. Chen. 2014. Is the inherent potential of maize roots efficient for soil phosphorus acquisition? PLoS ONE. 9(3):1-9.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division). 2015. Base de datos de la producción de alimentos y productos agrícolas. Obtenido en la Red Mundial el 19 de julio de 2016. http://faostat3.fao.org/browse/rankings/commodities_by_regions/S_

Feddermann, N., R. Finlay, T. Boller, M. Elfstrand. 2010. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza - the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. Fungal Ecol. 3(1):1-8.

Glassop, D., S.E. Smith, F.W. Smith. 2005. Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. Planta. 222(4):688-698.

Hao, L., J. Zhang, F. Chen, P. Christie, X. Li. 2008. Response of two maize inbred lines with contrasting phosphorus efficiency and root morphology to mycorrhizal colonization at different soil phosphorus supply levels. J. Plant Nutr. 31:1059-1073.

Hao, X.J., J.P. Hong, T.Q. Zhang, J.R. Li, W.J. Gao, Z.M. Zheng. 2014. Effects of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation and phosphorus (P) addition on maize P utilization and growth in reclaimed soil of a mining area. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 45(18):2413-2428.

Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil. 237:173-195.

Hong, J.J., Y.S. Park, A. Bravo, K.K. Bhattarai, D.A. Daniels, M.J. Harrison. 2012. Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *Brachypodium distachyon*. Planta. 236:851-865.

IMA (International Mycological Association). 2016. Obtenido en la Red Mundial el 10 de julio del 2016 http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=803198

INVAM (International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi). 2016a. Metodo para la extracion de esporas, Obtenido en la Red Mundial el 10 de julio del 2016. <http://invam.wvu.edu/methods/spores/spore-extraction>.

INVAM (International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi). 2016b. Método para la tinción de raíces micorrizadas, Obtenido en la Red Mundial el 10 de julio del 2016. <http://invam.wvu.edu/methods/mycorrhizae/staining-roots>.

INVAM (International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi). 2016c. Conteo de esporas, metodo de conteo directo de baja densidad, Obtenido en la Red Mundial el 10 de julio del 2016. <http://invam.wvu.edu/methods/spores/enumeration-of-spores>.

Invitrogen. 2002. Deoxyribonuclease I , Amplification Grade. Quality, (18068), p.3.

Javot, H., N. Pumplin, M.J. Harrison. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.* 30(3):310-322.

Kaeppler, S.M., J.L. Parke, S.M. Mueller, L. Senior, C. Stuber, W.F. Tracy. 2000. Variation among maize inbred lines and detection of quantitative trait loci for growth at low phosphorus and responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi. *Crop Sci.* 40(2):358-364.

Karandashov, V., M. Bucher. 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* 10(1):22-29.

Life Technologies. 2012. TRIzol ® Reagent. (15596026), pp.18-21.

Livak, K.J., T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 25(4):402-408.

Loth-Pereda, V., E. Orsini, P.E. Courty, F. Lota, A. Kohler, L. Diss, D. Blaudez, M. Chalot, U. Nehls, M. Bucher, F. Martin. 2011. Structure and expression profile of the phosphate *Pht1* transporter gene family in mycorrhizal *Populus trichocarpa*. *Plant Physiol.* 156(4):2141-2154.

Maeda, D. 2006. Knockdown of an Arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 47(7):807-817.

McGonigle, T.P., M.H. Miller, D.G. Evans, G.L. Fairchild, J. A. Swan. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115(3):495-501.

Nagy, R., V. Karandashov, V. Chague, K. Kalinkevich, M. Tamasloukht, G. Xu, I. Jakobsen, A.A. Levy, N. Amrhein, M. Bucher. 2005. The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and

Solanum tuberosum uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant J.* 42(2):236-250.

Nagy, R., M.J.V. Vasconcelos, S. Zhao, J. McElver, W. Bruce, N. Amrhein, K.G. Raghothama, M. Bucher. 2006. Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.). *Plant Biol.* 8(2):186-197.

Nussaume, L., S. Kanno, H. Javot, E. Marin, N. Pochon, A. Ayadi, T.M. Nakanishi, M.C. Thibaud. 2011. Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. *Front. Plant. Sci.* 2(83):1-12.

Ortas, I., Ç. Akpınar. 2011. Response of maize genotypes to several mycorrhizal inoculums in terms of plant growth, nutrient uptake and spore production. *J Plant Nutr.* 34:970-987.

Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Rev. Microbiol.* 6(10):763-775.

Promega. 2012. ImProm-IITM Reverse Transcription System Protocol. [online] pp.1–25. Disponible en: <http://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/impromii-reverse-transcription-system-protocol/>.

Ramaekers, L., R. Remans, I.M. Rao, M.W. Blair, J. Vanderleyden. 2010. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. *Field Crop. Res.* 117(2-3):169-176.

Rausch, C.M., Bucher. 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta.* 216(1):23-37.

Redecker, D., A. Schüßler, H. Stockinger, S.L. Stürmer, J.B. Morton, C. Walker. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza.* 23(7):515-531.

Richardson, A.E., J.P. Lynch, P.R. Ryan, E. Delhaize, F.A. Smith, S.E. Smith, P.R. Harvey, M.H. Ryan, E.J. Veneklaas, H. Lambers, A. Oberson, R.A. Culvenor, R.J. Simpson. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant Soil.* 349(1):121-156.

Ruiz-Espinoza, F.H., B. Murillo-Amador, J.L. García-Hernández, L. Fenech-Larios, E.O. Rueda-Puente, E. Troyo-Diéguez, C. Kaya, A. Beltrán-Morales. 2010. Field evaluation of the relationship between chlorophyll content in basil leaves and a portable chlorophyll meter (SAPD-502) readings. *J. Plant Nutr.* 33(3):423-438.

Sangabriel-Conde, W., S. Negrete-Yankelevich, I.E. Maldonado-Mendoza, D. Trejo-Aguilar. 2014. Native maize landraces from Los Tuxtlas, Mexico show varying mycorrhizal dependency for P uptake. *Biol. Fertil. Soils.* 50(2):405-414.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Cierre de la producción agrícola por cultivo; Anuario estadístico de la producción agrícola del 2015, Obtenido en la Red Mundial el 19 de julio del 2016. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

Smith, S.E., F.A. Smith. 2012. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia*. 104(1):1-13.

Smith, S.E., I. Jakobsen, M. Grønlund, F.A. Smith. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol*. 156(3):1050-1057.

Tamura, Y., Y. Kobae, T. Mizuno, S. Hata. 2012. Identification and expression analysis of arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter genes of soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 76(2):309-313.

Tian, H., R.A. Drijber, X. Li, D.N. Miller, B.J. Wienhold. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi differ in their ability to regulate the expression of phosphate transporters in maize (*Zea mays* L.). *Mycorrhiza*. 23(6):507-514.

Ticconi, C. A., S. Abel. 2004. Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends Plant Sci*. 9(11):548-555.

Vance, C.P., C. Uhde-Stone, D.L. Allan. 2003. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol*. 157(3):423-447.

Walder, F., D. Brulé, S. Koegel, A. Wiemken, T. Boller, P.E. Courty. 2015. Plant phosphorus acquisition in a common mycorrhizal network: regulation of phosphate transporter genes of the Pht1 family in sorghum and flax. *New Phytol*. 205(4):1632-1645.

Wright, D.P., J.D. Scholes, D.J. Read, S.A. Rolfe. 2005. European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytol*. 167(3):881-896.

Zhu, J., S.M. Kaeppler, J.P. Lynch. 2005. Topsoil foraging and phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*). *Funct. Plant Biol*. 32(8):749-762.

Zhu, X.C., F.B. Song, S.Q. Liu, T.D. Liu. 2011. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on photosynthesis and water status of maize under high temperature stress. *Plant Soil*. 346(1-2):189-199.