



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez"

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON HONGOS MICORRIZÓGENOS ARBUSCULARES NATIVOS DE MICHOACÁN EN *Persea americana* Mill. VAR. DRYMIFOLIA

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN FISIOLÓGÍA Y GENÉTICA VEGETAL

Presenta:

LEOVIGILDA REYES RAMÍREZ

Directora de tesis:

Doctora en Biotecnología de plantas
ANA TZTZQUI CHÁVEZ BÁRCENAS

Co-Directora
Doctora en Ciencias agrícolas
ANA ELIZABETH BÁRCENAS ORTEGA

Uruapan, Michoacán. Marzo, 2014



RESUMEN

Se ha demostrado que los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) favorecen la absorción de nutrimentos en plantas, al igual que incrementan la supervivencia y producción de biomasa, así como el contenido de carbohidratos. Por lo que en el presente trabajo se planteó evaluar el efecto de la inoculación de semillas de aguacate con tres especies de HMA aisladas de la zona aguacatera de Michoacán en el desarrollo, fisiología y morfología de las plantas en vivero. Para ello se aislaron, identificaron y propagaron tres especies característicamente abundantes en la región y de las cuales en trabajos previos se había encontrado presencia en raíces de aguacate de la misma zona geográfica (*Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae*, *Acaulospora scrobiculata*). Posteriormente se propagaron plantas de aguacate criollo mexicano a partir de semilla y se inocularon con las tres especies de HMA en tratamientos con cada especie en forma independiente, así como combinaciones de dos especies y un consorcio con las tres especies, haciendo un total de siete tratamientos y un testigo sin inocular (T8). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones, y se evaluó el desarrollo de las plantas por sus siguientes características: 1) Morfológicas: grosor y longitud del tallo, número de hojas, área de la raíz; 2) Fisiológicas: contenido de clorofila, sólidos solubles, contenido de azúcares, macro y micronutrientes, biomasa aérea y radical y 3) porcentaje de colonización. Los resultados mostraron que a partir de seis meses posteriores a la inoculación, las plantas inoculadas con *A. scrobiculata* y con *G. mosseae* presentaron características sobresalientes, como un mayor crecimiento y desarrollo vegetativos. Estos resultados sugieren que *A. scrobiculata* y *G. mosseae* presentes en la región aguacatera de Michoacán establecen relaciones simbióticas más activas con las plantas de aguacate de la misma región.

Palabras clave: endomicorrizas, portainjertos de aguacate, morfología, fisiología.

ABSTRACT

It has been proven that arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) favors the nutrient absorption in plants, they also increase the plant survival and biomass production, as well as the carbohydrate content. The aim of this work was to evaluate the effect of the inoculation of avocado seeds with three AMF species isolated from the avocado production area of Michoacan, in the development, physiology and morphology of avocado plants in nursery. To achieve this goal, three species of AMF were isolated, identified and propagated in the region, and these species were previously observed in the roots of avocado from the same geographical area (*Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae*, *Acaulospora scrobiculata*). Afterwards, Mexican creole avocado plants were propagated from seed and inoculated with the three species of AMF in treatments of each species inoculated independently, as in combinations of two species or the three species consortium, to make a total of seven treatments and a control without inoculants (T8). A randomized design with six replications was adopted and the development of plants was evaluated for the following features: 1) morphology: stem thickness, and length, number of leaves, root area, 2) physiological data: chlorophyll content, soluble solids, sugars contents, macro and micronutrients, shoot and root biomass and 3) percentage of colonization. The results showed that after six months after the inoculation, the plants inoculated with *A. scrobiculata* and *G. mosseae* showed outstanding characteristics, such as increased vegetative growth and development. These results suggest that *A. scrobiculata* and *G. mosseae* present in the avocado region of Michoacan establish more active symbiotic relationships with plants of avocado in the same region.

Keywords: endomycorrhizae, avocado rootstocks, morphology.

Contenido

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 HIPÓTESIS	3
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos específicos:	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Producción del cultivo del aguacate	4
2.1.1 Situación mundial	4
2.1.2 Situación nacional	4
2.2 Características del aguacate	4
2.2.1 Clasificación botánica del aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.)	6
2.2.2 Características de <i>Persea americana</i> Mill. var. <i>drymifolia</i> .	6
2.3 Manejo del Cultivo del aguacate	7
2.4 Los microorganismos del suelo y la rizósfera	8
2.4.1. Las micorrizas	9
2.4.2 Tipos de asociaciones micorrízicas	9
2.4.3 Los hongos micorrizógenos arbusculares	11
2.5. Características de los hongos micorrizógenos	11
2.5.1. Estructuras características de HMA en simbiosis	12
2.5.2 Fases de la colonización de HMA	13
2.5.3 Taxonomía de los HMA	16
2.5.4 Factores que afectan la simbiosis planta-hongo	16
2.5.5 Beneficios de los HMA para las plantas	17
2.5.6 Aplicación de HMA para control de patógenos	18
2.5.7 Adquisición de P	19
2.5.8 Adquisición de N	21
2.6 Estudios sobre identificación de HMA en rizósfera de aguacate en Michoacán	22
2.7 Aplicación de HMA en aguacate	22
2.8 Inoculantes	25
2.8.1 Propagación de los HMA	25
2.8.2 Cultivos trampa y monoespecíficos	26
2.8.3 Métodos y formas de aplicación de los Inoculantes	27
2.9 Uso de los HMA nativos en la agricultura	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30

3.1 Propagación, identificación, selección e inoculación de HMA	30
3.1.1 Obtención de HMA nativos del cultivo de aguacate	30
3.1.2 Propagación de HMA en macetas con cultivos trampa	30
3.1.3 Extracción de esporas	31
3.1.4 Montaje e identificación de especies de HMA	31
3.1.5 Selección de especies de HMA	32
3.1.6 Cuantificación de esporas	32
3.1.7 Propagación de los HMA seleccionados en cultivos monoespecíficos	32
3.1.8 Establecimiento de plántulas de aguacate	33
3.1.9 Inoculación y manejo de las plántulas de aguacate	34
3.2 Variables morfológicas a evaluar en plántulas de aguacate	35
3.2.1 Porcentaje de colonización	35
3.2.2 Variables de crecimiento de las plantas	35
3.2.3 Determinación del área foliar y radicular	36
3.3 Variables fisiológicas a evaluar en plántulas de aguacate	36
3.3.1 Biomasa aérea y radicular	37
3.3.2 Relación MSF/MSR	37
3.3.3 Contenido de clorofila	37
3.3.4 Determinación de Sólidos solubles	38
3.3.5 Contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores y almidón	38
3.3.6 Contenido de nutrientes	40
3.4 Diseño experimental	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1 Propagación, identificación, selección, cuantificación e inoculación de HMA	43
4.1.1 Selección de las especies propagadas	43
4.1.2 Cuantificación de esporas	45
4.1.3 Cultivos mono específicos	48
4.2 Efecto de la inoculación de HMA sobre la morfología de plantas de aguacate	49
4.2.1 Características del sustrato utilizado para germinación de plántulas de aguacate	49
4.2.2 Porcentaje de colonización	49
4.2.3 Altura de plantas	52
4.2.4 Diámetro del tallo	56
4.2.5 Número de hojas	59
4.2.6 Área Foliar	60
4.2.7 Área radicular	61
4.2.8 Biomasa aérea y de la raíz	63
4.2.9 Relación MSA/MSR.	66
4.3 Efecto de la inoculación de HMA sobre la fisiología de plantas de aguacate.	67
4.3.1 Concentración de clorofila en hojas de aguacate	67

4.3.2 Contenido de sólidos solubles en tejido foliar	71
4.3.3 Contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores y almidón	72
4.3.4 Nutrientes en tejido foliar	79
V. CONCLUSIONES	84
VI. LITERATURA CITADA	87
VII. ANEXOS	102

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del aguacate tiene importancia agrícola y económica por las diversas actividades y empleos que genera; México es líder mundial por la superficie cultivada, producción, consumo y exportación de este frutal. En el estado de Michoacán se encuentra más del 80 % de la superficie sembrada del país, con una producción anual de un millón de toneladas (SIAP, 2011). El cultivar ‘Hass’ es el más utilizado para la producción en el estado, establecido sobre porta injertos denominados “criollos”.

Las plántulas son producidas en viveros de la región, la preparación del sustrato para su establecimiento, consiste en la desinfección de suelo a base de productos químicos o mediante solarización con la finalidad de evitar enfermedades o plagas, procedimiento que, de acuerdo con Salamanca y Cano (2005), elimina o reduce los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) nativos, lo que afecta la captación de nutrientes por las plantas, especialmente el fósforo.

Una de las alternativas para incrementar los microorganismos benéficos y la producción agrícola es la aplicación de biofertilizantes producidos a partir de HMA, los que al establecer una simbiosis con las raíces de las plantas desempeñan importantes funciones; algunos pueden favorecer la absorción de nutrientes y agua, contribuir de forma más eficiente a la supervivencia y el crecimiento de los cultivos, además de reducir los efectos de estrés asociados con la nutrición y el agua (Rivera *et al.*, 2011) e inducir resistencia a fitopatógenos (Aguilera-Gómez *et al.*, 1999, Hodge *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que los HMA colonizan las raíces de aguacate, que carece de tricoblastos (Salazar, 2002) por lo que es altamente dependiente de la simbiosis micorrízica (Alarcón *et al.*, 2001). Estudios sobre la respuesta de plantas de aguacate generadas en vivero mediante semilla, tratadas con diversos inóculos comerciales, reportan que los HMA favorecen la absorción de nutrimentos e incrementan la supervivencia y producción de biomasa aérea (Azcón *et al.*, 2004; Mena-Violante *et*

al., 2006), así como la altura de la planta y el contenido de nutrimentos y carbohidratos (Silveira, 2003).

En la región existen reportes de especies de HMA aisladas de la rizósfera del aguacate en la zona aguacatera del estado (Bárcenas *et al.*, 2006; Aguirre *et al.*, 2009). Bárcenas *et al.* (2011) reportaron la presencia de 49 morfoespecies de HMA encontrados en huertos de aguacate, de siete climas en los que se encuentra establecido el 98.6% de los huertos del estado de Michoacán.

La aparente baja diversidad de los HMA ha conducido a creer que son funcionalmente redundantes y que no existe especificidad taxonómica, sin embargo, evidencias recientes obtenidas con técnicas moleculares indican que las plantas son colonizadas preferentemente por ciertas especies de HMA con base en sus efectos diferenciales sobre el crecimiento vegetal (Lovera y Cuenca, 2007; Van der Heijden *et al.*, 1998). En algunos casos las especies que mejor promueven el crecimiento de un hospedero pueden retrasar el crecimiento en otro (Talukdar y Germida 1994).

Barrer (2009) comenta que en Chile, plantas de un ecotipo local de Pimentón sometidas a tratamiento con HMA nativos presentaron mejores resultados que las plantas inoculadas con HMA comerciales, lo mismo sucedió en la aclimatación de plantas micropropagadas de banano al ser inoculadas con HMA provenientes de suelos bananeros de Colombia, lo que evidencia la importancia de utilizar cepas locales de HMA nativos como biofertilizantes por encontrarse mejor adaptadas a las condiciones edafoclimáticas regionales. Por ello, es necesario estudiar la diversidad natural para utilizarse en la producción comercial (Trejo *et al.*, 2011).

Dadas las ventajas que le brindan los HMA a las plantas de aguacate, que por carecer de tricoblastos son altamente dependientes de los mismos y de la necesidad de utilizar cepas locales de HMA, es importante estudiar el efecto de especies de HMA nativos de la zona aguacatera del estado de Michoacán sobre plántulas de aguacate obtenida por semilla, lo que permitirá evaluar y conocer los beneficios para las plantas de aguacate y constituir una opción para el desarrollo y nutrición de la plántula en esta etapa.

1.1 HIPÓTESIS

La inoculación con especies de HMA nativas de huertos de aguacate de Michoacán, ocasionará un efecto positivo sobre parámetros morfológicos y fisiológicos en el desarrollo de las plántulas de aguacate.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de tres especies de hongos micorrizógenos arbusculares seleccionados de huertos de aguacatero de Michoacán sobre la morfología y fisiología de plántulas de *Persea americana* Mill var. *drymifolia* en etapa de vivero.

1.2.2 Objetivos específicos:

- Seleccionar y propagar tres especies de hongos micorrizógenos arbusculares para inocular plantas de aguacate criollo.
- Evaluar los efectos sobre la morfología y fisiología de plantas de aguacate, inoculadas con cada una de las tres especies de HMA propagadas, de manera combinada (dos especies) y por un consorcio compuesto de las tres especies.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Producción del cultivo del aguacate

2.1.1 Situación mundial

El aguacate es uno de los cultivos importantes a nivel mundial, con una superficie de 436,280 ha y una producción de 3,853,898 toneladas al final de la temporada 2009, en la cual México se ubicó como el principal país productor, con una superficie de 121,491 ha y 1,230,970 toneladas, seguido de Chile, Estados Unidos e Indonesia (FAO, 2011).

2.1.2 Situación nacional

Según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el avance de siembras y cosechas, en la modalidad de riego y temporal, la situación del cultivo del aguacate al 30 de diciembre de 2010, indicaba que se produjeron en México 1,077,505 toneladas, de las cuales Michoacán aportó 920,276 toneladas, lo cual representó el 85.4 % del total nacional, seguido de Jalisco con el 2.8 %, Morelos con el 2.5 %, Nayarit con el 2.4 %, el Estado de México con el 2.0 %, y el 4.9 % restante lo aportaron los demás estados productores (SAGARPA, 2011).

2.2 Características del aguacate

El aguacate se agrupa en tres razas o tipos; guatemalteca, mexicana y antillana, las cuales han sido clasificadas según sus características físicas y origen en tres variedades botánicas de la misma especie. Es una planta perenne originaria de las montañas y bosques tropicales y subtropicales de México y Centroamérica (Sánchez *et al.*, 2001) de gran crecimiento vegetativo, en su hábitat natural alcanza una altura de 10 a 15 metros. Con raíces superficiales, que absorben agua y nutrientes principalmente en las puntas a través de los tejidos primarios; esto determina la

susceptibilidad del árbol al exceso de humedad que induce a ataques de hongos y pudriciones vasculares. Las ramas son abundantes, delgadas y frágiles, sensibles a las quemaduras de sol y a las heladas, se rompen con facilidad al cargar muchos frutos o por acción del viento, las flores son hermafroditas, simétricas, de color verde amarillento. Las hojas son alternas, pecioladas y simples, de forma variable: oval-oblongas, elípticas, o aovadas y están provistas de yemas axilares. El ápice es más o menos agudo según la raza. La dimensión de las hojas varía desde 5 a 20 cm de longitud y de 3 a 10 cm de ancho, la cara superior es glabra mientras que la inferior es ligeramente pubescente. La nervadura principal tiene color amarillo pálido y especialmente es prominente en la cara inferior (Calabrese, 1992).

Comúnmente presenta dos o más flujos de crecimiento vegetativo durante un ciclo de crecimiento anual. El ambiente, principalmente la radiación solar, temperatura y disponibilidad de agua, así como las prácticas culturales pueden tener un efecto determinante sobre el número e intensidad de los flujos de crecimiento vegetativo (Salazar, 2002). Es apreciado en la agricultura por la producción de frutos comestibles, usados para comercializar en fresco o bien procesado.

La raíz es un órgano de importancia para la absorción y transporte de agua y nutrimentos, es donde se sintetizan y/o almacenan compuestos orgánicos como reguladores del crecimiento, carbohidratos, nutrimentos, entre otros. Las raíces alimentadoras del aguacate se localizan entre los primeros 5 cm y hasta los 45 cm de profundidad; distantes de 2 hasta 25 m retirados del tronco alrededor de la capa arbórea o zona de goteo (Salazar, 2002). Este sistema radicular es muy particular, ya que carece o tiene pocos tricoblastos lo cual limita el área de absorción tanto de nutrientes como de agua (Téliz y Mora, 2007; Vhiley *et al.*, 2002). La absorción de agua y nutrientes se realiza a través células corticales las que se alargan y suberizan constituyendo la exodermis, la cual tiene como función proteger el parénquima cortical. El deterioro o daño que pueda sufrir la exodermis, determina la susceptibilidad del árbol al exceso de humedad que induce el ataque de hongos que infectan los tejidos.

2.2.1 Clasificación botánica del aguacate (*Persea americana* Mill.)

Según Köpp y García, (1978), el Aguacate pertenece a la Familia: Lauráceae, Subfamilia: Lauroideae, Tribu: Perseineae, Género: *Persea*, Especie: americana y cuenta con tres Subespecies, razas o variedades botánicas: *drymifolia*, *guatemalensis* y *americana*.

2.2.2. Características de *Persea americana* Mill. var. *drymifolia*.

La raza Mexicana, cuya evolución y dispersión se cree ocurrió en las faldas de las montañas de México, es la más tolerante a bajas temperaturas, produce frutos más pequeños pero con un contenido mayor en aceite y se distinguen muy fácilmente porque sus hojas despiden un aroma a anís. Árboles de hasta 15 m de alto, ramas poco a moderadamente pubescentes con pelo pubescente color pálido. Hojas verde oscuro y aromáticas como la corteza de 5-20 cm de largo, 3-12 cm de ancho elípticas con ápice agudo, la superficie adaxial glauca, la abaxial moderadamente pubescente, escasas venas secundarias divergentes a 35-55°, moderada a prominente impresa en las superficies abaxial; pecíolos 1-4 cm de largo. Inflorescencias subterminales con brácteas, pubescentes en ambas superficies con pelos flexuosos, pedicelos de 5 mm de largo, con pubescencia. Flores regulares, estambres 2-3 mm de largo, filamentos de series I y II pubescentes, las anteras con cuatro lados; estaminodios sagitados; gineceo pubescente. Fruto de tres a seis por rama terminal, con tamaño de 4-12 cm de largo, ovoide o piriforme, exocarpo delgado de color verde oscuro, marrón, morado o negro; semillas ovadas grandes de superficie lisa, suelta en la cavidad de la semilla. Este taxón representa ampliamente las plantas cultivadas. En su hábitat indígena se distribuyen en las montañas centrales de México y en la cadena montañosa del Sur en altitudes mayores de 1000 m en los climas cálido y húmedo, suelos semiáridos a fértiles, así como en los suelos ácidos con bajo contenido de nutrientes. Algunos ejemplares han sido encontrados en bosques de coníferas en el norte de Guatemala, donde sus gamas se traslapan con la var. *guatemalensis*. Árboles sin aroma a anís se han reportado (Storey *et al.*, 1986). La variedad *drymifolia* es reconocible por su apariencia pubescente en la etapa de plántulas, aroma característico a anís.

Su distribución natural va desde la República Mexicana hasta Perú, pasando por Centro América, Colombia, Venezuela y Ecuador (Williams, 1976). Se distribuye en México, en los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas y Veracruz. En Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Panamá.

2.3 Manejo del Cultivo del aguacate

En la mayoría de los países productores de aguacate, se tienen problemas de bajos rendimientos, atribuidos principalmente a la nutrición y fertilidad del suelo (Sánchez, 2007). El aguacate es hasta cierto punto, un cultivo rústico, los nutrimentos que más demanda son el potasio y el nitrógeno, seguido del fósforo (Téliz y Mora, 2007); en la región aguacatera de Michoacán los suelos predominantes son andosoles, que son normalmente sueltos y muy susceptibles a la erosión, presentan buena aireación y drenaje, pero son pobres en nutrientes, los cuales se lixivian con facilidad además de la biodisponibilidad de aluminio que se ha descrito en suelos ácidos los cuales suelen tener problemas de fijación de fósforo (Sánchez, 2007). Para resolver algunos de estos problemas en la actualidad se usan fertilizantes y/o insumos que mantengan, mejoren el ambiente y al mismo tiempo suministren los nutrimentos necesarios a la mayoría de los cultivos.

Los nutrientes son absorbidos por las raíces de las plantas en formas iónicas, independientemente del origen de procedencia como fuentes orgánicas o inorgánicas, después de que los iones han sido absorbidos por las raíces las rutas y procesos metabólicos son los mismos, sin distinción de la fuente que aportó los nutrimentos (Salazar, 2002). En esta región aguacatera, la variedad Hass es la más cultivada y existe interés por mantener la producción con disminución de contaminación del medio ambiente por lo que se han adoptado programas como buenas prácticas agrícolas que promueven la protección del ambiente con el fin de generar un sistema de producción agrícola sustentable a largo plazo y obtener productos libres de residuos tóxicos (Navarro, 2009).

2.4 Los microorganismos del suelo y la rizósfera

Los microorganismos del suelo desempeñan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos para mantener la calidad del suelo, los microorganismos que viven en el área de influencia de la raíz, conocida como rizósfera, llevan a cabo gran variedad de funciones que en muchos casos son benéficas para las plantas, en particular la actividad microbiana en la rizósfera es el factor que controla y determina la disponibilidad de nutrientes para las plantas y tiene una influencia significativa sobre la estabilidad y productividad vegetal (Jeffries *et al.*, 2003). Bacterias y hongos son los principales componentes de la biomasa microbiana del suelo (Baath *et al.*, 2003). Dentro de los diferentes grupos de microorganismos presentes en la zona rizosférica, existen tres tipos benéficos que son cruciales para el buen funcionamiento de los ecosistemas terrestres: las bacterias fijadoras de nitrógeno, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Somers y Vanderleyden, 2004) y los hongos formadores de micorriza (Alexander, 1980). La rizósfera es el ambiente del suelo que la planta ayuda a crear, donde los microorganismos patógenos y benéficos tienen influencia sobre la salud y crecimiento de las plantas y sobre la modificación de las propiedades del suelo. Es amplio el grupo de microorganismos que lo conforman incluye bacterias, hongos, nemátodos, protozoos, algas y microartrópodos (Johansson *et al.*, 2004). Sánchez *et al.*, (2006) mencionan que los hongos formadores de micorriza arbuscular constituyen un componente fundamental de las comunidades microbianas en la rizósfera. La rizósfera del suelo se define como el volumen del suelo adyacente y está influenciada por las raíces de la planta, y representa una región de intensa actividad microbiana (Westover *et al.*, 1997), existe expresión de relaciones simbióticas mutualistas entre microorganismos y plantas, con exudación de nutrimentos orgánicos útiles para el metabolismo microbiano por parte de la raíz que proporciona un nicho ecológico a los microorganismos, estos a la vez, participan en numerosos beneficios, como: influencia en el crecimiento radical, regulación de la actividad metabólica de la raíz e influencia en las propiedades físicas y químicas del suelo (González-Chávez, 2005; Rilling y Mummey, 2006), por lo que se atribuye a los microorganismos un potencial

para contribuir a la solución de múltiples problemas en la agricultura; los biofertilizantes con base en micorrizas son una alternativa para reducir pérdidas en los procesos de multiplicación de especies frutales, mejorar la aclimatación y nutrición de frutales de importancia económica (Azcón y Barea, 1997; Mena-Violante *et al.*, 2006).

2.4.1. Las micorrizas

La palabra micorriza se refiere a la asociación entre raíces de las plantas y los hongos que colonizan el tejido cortical de la raíz durante periodos de crecimiento de la planta. La asociación se caracteriza por la simbiosis en donde la planta aporta al hongo fotosintatos o productos derivados de la fijación de carbono como: azúcares, carbohidratos entre otros y el hongo facilita a la planta la obtención de nutrientes como: fósforo, zinc y cobre. Se calcula que una raíz colonizada por micorrizas puede absorber el fósforo (P) cuatro veces más que una raíz sin micorrizas. La mayoría de las plantas forman asociaciones simbióticas con hongos (Salazar, 2002). Las asociaciones micorrízicas son cosmopolitas por su presencia en la mayoría de hábitats naturales terrestres y obicuas por el amplio número de familias de plantas susceptibles a la colonización, por ello la asociación raíz-planta es considerada como la norma en ambientes naturales, e incluso se dice que las plantas más que presentar raíces presentan micorrizas (Hernández *et al.*, 2003). Es aceptado que las micorrizas mejoran el enraizamiento de las plantas y su establecimiento en el suelo, facilitan el ciclado de nutrimentos (Jeffries y Barea, 2001) incrementan la resistencia de las plantas a situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico, mejoran las propiedades físicas y químicas del suelo y facilitan la sucesión vegetal.

2.4.2 Tipos de asociaciones micorrízicas

La clasificación de los HMA, según su morfología, se basa solamente en el lugar que ocupa el micelio fúngico en relación a la estructura de la raíz. Las ectomicorrizas, se encuentran establecidas en el exterior de las raíces, rodeando las células de la epidermis y de la corteza sin penetrar las células y las endomicorrizas, que se localizan al interior de las raíces de las plantas penetrando la célula (Brundett, 2004).

De acuerdo con Reid, (1990) las micorrizas se pueden subdividir, dependiendo de la morfología tanto del hongo como de la planta hospedante, en cinco grupos que se mencionan a continuación (Reid, 1990; Guerrero, 1996; Brundett, 2004).

1. Ectomicorriza. Se caracteriza porque las hifas del hongo no penetran el interior de las células de la raíz, formando un manto compacto de hifas que cubre las raíces con una red micelial, llamada red de Harting en la corteza, además de estructuras como vaina y micelio extraradical. Predomina entre los árboles de zonas templadas, siendo especialmente característico en pinos, hayas, robles y eucaliptos; los hongos que tienen este tipo de asociación son generalmente basidiomicetos o ascomicetos.

2. Micorrizas de ericales. Se establecen en plantas del orden Ericales, presentan características de ectomicorrizas y micorrizas arbusculares, se clasifican en tres tipos: a) Ericoidal. La forman sólo hongos ascomicetos con plantas del orden ericales cultivadas en suelos ácidos. b) Arbutoide. La forman sólo hongos basidiomicetos con especies de *Arbutus* y *Arctostaphylos*, se caracterizan por formación de manto externo y penetración en las células, donde forman rulos. c) Monotropoide. La forman hongos basidiomicetos con la familia de monotropáceas.

3. Endomicorriza. Conocida como micorriza arbuscular (MA) se caracteriza por presentar un desarrollo fúngico de estructuras inter e intra celulares dentro del corte de la raíz formando estructuras como vesículas y/o arbúsculos.

4. Ectendomicorrizas. Es un grupo particular de micorrizas que son formadas solamente en géneros de la familia Pinaceae. Forman red de Harting como las ectomicorrizas y al mismo tiempo hay penetración de células corticales por hifas septadas pero sin formar vesículas y arbúsculos.

5. Micorrizas de orquídeas. En esta simbiosis hay formación de enrollamientos de hifas entre las raíces o tallo de la planta llamados ovillos. Las orquídeas pasan por un estado en semillero prolongado durante el cual son incapaces de realizar fotosíntesis, además que sus semillas tienen escasas reservas de almidones y lípidos. En condiciones naturales, estos requerimientos son suplidos por el hongo micorrícico. La planta es colonizada después de la germinación, y el hongo sule el

carbono y las vitaminas para el desarrollo del embrión hasta cuando se forman las hojas y se inicia la fotosíntesis. Los hongos que participan en la simbiosis pertenecen al phylum Basidiomycota, algunos de los géneros que para otras plantas son patógenos como *Armillaria*, *Fomes*, *Marasmius* y *Rhizoctonia* (*R. Solani* y *R. Repens*) (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1983).

2.4.3 Los hongos micorrizógenos arbusculares

La micorriza arbuscular es una simbiosis mutualista que se forma entre las raíces de la mayoría de las comunidades vegetales herbáceas y árboles tropicales y un pequeño grupo de hongos colonizadores de la raíz (Varela y Trejo, 2001) que fueron recientemente ubicados en un Phylum denominado Glomeromycota (Schüßler, 2010). En la naturaleza, la mayoría de plantas presentan este tipo de asociación, de manera que algunos consideran que, estrictamente hablando, la mayoría de las plantas no tienen raíces, sino que tienen micorrizas (Bonello, 2001).

2.5 Características de los hongos micorrizógenos

Los hongos micorrizógenos se caracterizan por presentar una amplia distribución y constituyen posiblemente el grupo más importante dentro de los microorganismos relacionados con la nutrición de las plantas debido a la propiedad de transferir fósforo y otros nutrientes importantes para las plantas durante su desarrollo celular (Dever *et al.*, 2001; Cuenca *et al.*, 2007), pueden contribuir a la formación de la estructura del suelo (Piotrowski *et al.*, 2004) mediante la segregación de una glicoproteína; glomalina la que permite una mayor tolerancia a periodos prolongado de sequía (Sieverding y Toro, 1998), actúan como antagonistas contra varios patógenos del suelo (Baath y Hayman, 1983) y son capaces de mantener la diversidad de plantas en los diferentes ecosistemas terrestres (Lovelock *et al.*, 2003).

Los hongos arbusculares necesitan de una planta, debido a la ausencia de síntesis nuclear propia de ácido desoxirribonucleico (ADN), por lo que necesitan de una planta para multiplicarse (Hendrix *et al.*, 1995, Calvet *et al.*, 1999). Sin embargo se

conoce que estos hongos son capaces de sintetizar material nuclear (Bago *et al.*, 2002).

2.5.1 Estructuras características de HMA en simbiosis

Este tipo de asociación está regida fundamentalmente por los genomas de la planta y el hongo, modulada a su vez por el medio ambiente (Krishna, 1985; Dehne, 1989 y Gianinazzi, 1989). Las estructuras comunes de estos hongos son hifas, arbuscúlos, vesículas y esporas, primero las esporas de HMA germinan para posteriormente iniciar la colonización de las raíces, son las estructuras de los HMA más resistentes a condiciones adversas, por lo tanto su función principal es la propagación y preservación (Abbott y Robson, 1991). El micelio del hongo crece hasta encontrar una raíz para comenzar la colonización de las células corticales y producir los arbuscúlos, con cambios a nivel celular y activación de genes relacionados con reorganización celular, formación de membranas y transporte de Pi (Reinhardt, 2007). Los arbuscúlos cumplen con la función del intercambio de nutrientes, las vesículas de almacenamiento; sin embargo las vesículas no se forman en los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* (Gianinazzi, 1983; Gianinazzi-Pearson, 1998; Brundrentt, 2008) y las hifas extrarradicales que se extienden dentro del suelo incrementan el potencial de exploración del sistema radical (Linderman, 1992), tienen la función de exploración, absorción y translocación de nutrición al hospedante.

En esta simbiosis se identifican dos tipos de clases morfológicas; nombradas tipo Arum y tipo Paris (Fig. 1), los nombres hacen relación al tipo de planta donde fueron observadas. El tipo Arum consiste en asociaciones que crecen de manera intercelular a través de la corteza externa, aunque una hifa atraviesa la célula directamente, una vez dentro de las células corticales, las hifas forman ramificaciones llamadas arbuscúlos (Harrison, 2005; Peterson *et al.*, 2004). El tipo Paris se caracteriza por ausencia o escaso desarrollo de hifas intercelulares presenta desarrollo de enrollamientos, observadas en especies herbáceas y árboles silvestres (Smith, 1997; Dickson, 2004).

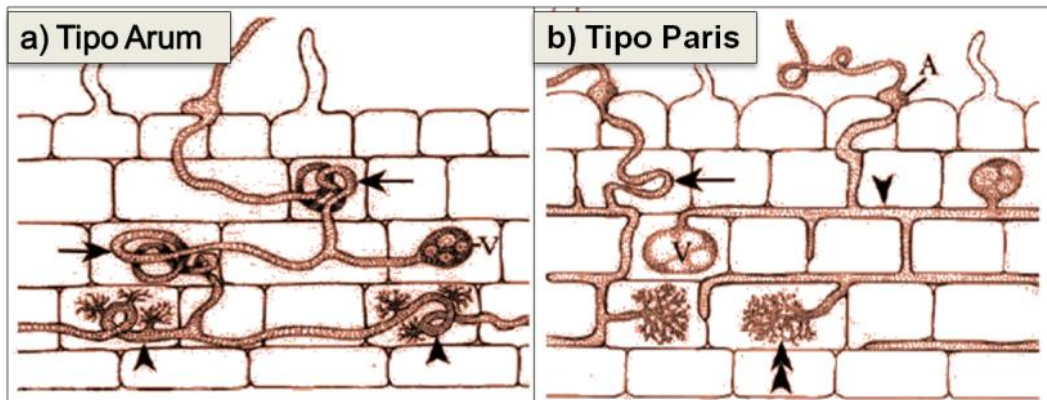


Figura 1. Tipos de asociación micorrizica arbuscular. a) Tipo *Arum* caracterizado por hifas que crecen de forma intercelular (cabeza de flecha) b) Tipo *Paris*, caracterizado por hifas con crecimiento intracelular (cabeza de flecha). Se aprecian vesículas (v), el apresorio (A) hifas (flechas) y arbuscúlos (dos cabezas de flechas). Tomado de Peterson *et al.* (2004).

2.5.2 Fases de la colonización de HMA

Las relaciones de las plantas-HMA se basan en la interacción de señales de reconocimiento, es un proceso complejo caracterizado por distintos estadios del establecimiento del hongo, en las que se caracterizan diferentes fases: asimbiótica, presimbiótica, formación de apresorio, colonización y formación de arbuscúlos (Barea *et al.*, 1991).

En la fase asimbiótica se lleva a cabo la germinación de esporas y producción de una cantidad limitada de micelio (Bucher, 2006). Las esporas de HMA germinan y durante esta fase el hongo vive principalmente de sus reservas de triacilglicéridos, ya que las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio en el que se localiza, tienen poco efecto sobre su desarrollo (Requena *et al.*, 2007).

En la fase presimbiótica, la raíz estimula el crecimiento de hifas germinativas mediante compuestos volátiles de exudados de la raíz como el CO_2 (Bago *et al.*, 2000) y hormonas (Akiyama *et al.*, 2005; Hause *et al.*, 2007), y se considera como la primera señal de interacción planta-hongo, la cual es producida especialmente bajo condiciones de déficit de fósforo (Pi) (Akiyama *et al.*, 2005), los flavonoides (Vierheilig y Piché, 2002) y algunas hormonas que afectan diferencialmente el

crecimiento del hongo (Hause *et al.*, 2007). La ubicación de las raíces por las hifas del hongo, se logra mediante señales tigmotrópicas y metabolitos secundarios (Requena *et al.*, 2007).

Para la fase formación de apresorio o de pre-colonización, el hongo desarrolla estructuras reponsables del contacto y penetración del tejido vegetal denominadas apresorios; su formación sobre las células epidérmicas es producto del aumento de la presión hidrostática en la zona apical de la hifa del hongo que se conoce como aparato de pre-penetración (PPA) por donde la hifa ingresa (Fig. 3), a la célula de la epidermis (Genre *et al.*, 2005). Para lograr la penetración a la epidermis radical, la planta emite ciertas hormonas denominadas estrigolactonas que activan el metabolismo y ramificación del micelio, mostrado ser una señal fundamental en el desarrollo de la simbiosis (Akiyama *et al.*, 2005); en tanto, los hongos activan señales de transducción que son reconocidas por las plantas (Bonfante y Requena, 2011).

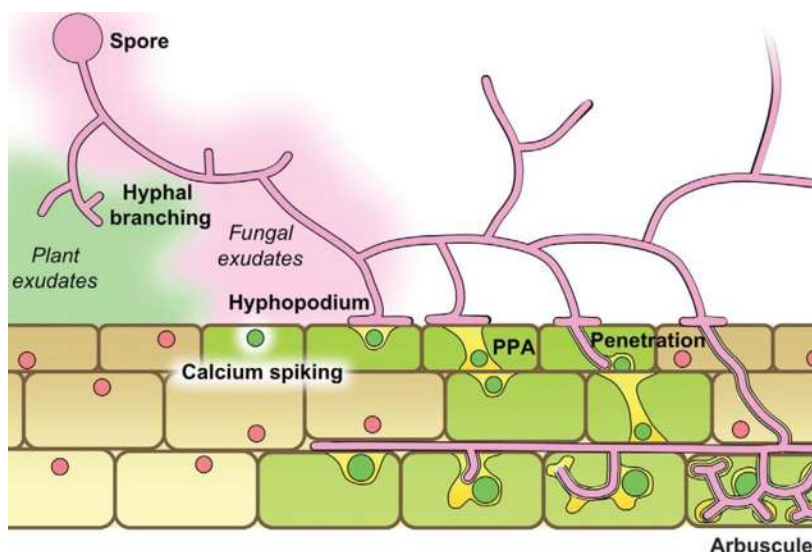


Figura 2. Esquema del proceso de colonización de HMA (Bonfante y Genre, 2010).

Fase de colonización y formación de arbuscúlos. Las hifas penetran la epidermis con la combinación de procesos mecánicos y enzimáticos para después colonizar las zonas de tejido parenquimático (Ezawa *et al.*, 1995). El crecimiento intercelular es a partir de la hifa de penetración que se extiende entre las células de la epidermis hacia la corteza de la raíz, sin penetrar el sistema vascular ni los meristemos radicales, la penetración de espacios intercelulares, se debe en gran medida al

desarrollo de enzimas pectolíticas, celulasas, xiloglucanasas, exo y endoglucanasas emitidas por el hongo (García y Ocampo, 2002). Para la formación de los arbusculos intracelularmente, hay un aumento en la superficie de contacto entre el hongo y la célula de la planta. También se pueden formar vesículas y células auxiliares, dependiendo de la especie fúngica; con la formación de esporas, se cierra el ciclo de vida de los HMA.

El proceso de colonización y el establecimiento de una asociación activa involucra un sin número de interacciones morfofisiológicas y bioquímicas entre las hifas del hongo y las células de las raíces de la planta, las cuales incluyen el contacto entre la hifa del hongo y la superficie de la raíz, la diferenciación para formar apresorios, penetración y crecimiento de la hifa dentro de la raíz y una subsecuente diferenciación de estructuras especializadas (los arbusculos) dentro de la célula cortical, que incluye modificaciones en las células del huésped, como es la invaginación del plasmalema de la célula de la planta, fragmentación de la vacuola y un incremento en el número de organelos tales como el Aparato de Golgi, (Harrison y Dixon, 1993; Bonfante y Perotto, 1995; Niemira *et al.*, 1996).

El desarrollo del micelio extramatricial en el suelo forma las estructuras ramificadas de absorción, estas aumentan considerablemente la superficie de absorción de la planta y su capacidad para captar nutrientes y agua. Así también durante el establecimiento de la simbiosis se producen movimientos de fotosintatos de la planta de la parte aérea hasta la zona de la raíz, estos son tomados por el microsimbionte, la mayoría se utiliza para producir energía metabólica que asegura su mantenimiento y desarrollo, mientras que el resto se moviliza en forma de azúcares y lípidos hasta la masa fúngica intra y extraradical (Bowen, 1987 y Bonfante y Perotto, 1995). Desde la planta hacia el hongo ocurre la transferencia de carbohidratos, en forma de sacarosa, provenientes de la fotosíntesis vía floema, los que son hidrolizados a través de la enzima invertasa para producir dos monómeros, estos a su vez se descomponen y se fosforilan para convertirse en moléculas de triosa-P, que se transfieren al simbionte vía arbusculos. Estudios desarrollados demostraron que al establecerse la

simbiosis se incrementó notablemente la biomasa de la planta hospedera, lo que conllevó a un aumento de la tasa fotosintética entre un 4 y 20 % (Bago *et al.*, 2005).

2.5.3 Taxonomía de los HMA

Recientemente se ha clasificado a los HMA con base en la filogenia de ADN ribosomal en el Phylum Glomeromycota con cuatro órdenes, (Cuadro1) 11 familias y 17 géneros (Schüssler y Walker, 2010).

Cuadro 1. Clasificación de los hongos del Phylum Glomeromycota

ÓRDENES	FAMILIAS	GÉNEROS
Glomerales	Glomeraceae	Glomus
		Funneliformis
		Rhizophagus
		Sclerocystis
Diversiporales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglomus
	Gigasporaceae	Gigaspora
		Scutellospora
		Racocetra
		Acaulospora
	Entrophosporaceae	Entrophospora
	Diversisporaceae	Diversispora
		Otospora
		Redeckera
		Pacispora
Paraglomerales	Paraglomeraceae	Paraglomus
Archaeosporales	Geosiphonaceae	Geosiphon*
	Ambisporaceae	Ambispora
	Archeosporaceae	Archaeospora

2.5.4 Factores que afectan la simbiosis planta-hongo

El suelo contiene diversas estructuras de HMA como hifas que difícilmente pueden ser aisladas, o bien esporas que por diversas condiciones no germinan. El

establecimiento de la simbiosis micorrizica resulta de una secuencia de eventos coordinados por el hongo y sus interacciones y culmina con una relación simbiótica caracterizada por la perfecta integración morfológica, bioquímica y funcional (Moreira y Siqueira, 2002), sin embargo, el reconocimiento, establecimiento y eficiencia de una asociación micorrízica dependen de factores como: a) tipo de hongo, su tasa de crecimiento interior y exterior en la raíz, b) planta hospedante como genotipo, exudados radicales, geometría radical, presencia de pelos radicales y de raíces laterales y c) los factores biofísicoquímicos del suelo como pH, humedad, textura, fertilidad, tipo de microorganismos (Smith y Giagnazzi, 1988; Varela y Estrada, 1999).

Las especies de HMA pueden diferir en su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas, así como distintas especies vegetales pueden responder diferencialmente a la inoculación con HMA (Vierheiling y Ocampo, 1991; Schweiger *et al.*, 2007).

Varios factores edáficos, tanto del tipo biótico como son las relaciones HMA con bacterias u otros microorganismos y abiótico, climáticos y particularmente las prácticas agrícolas como aplicación de pesticidas, fertilizantes, fungicidas, pueden afectar el desarrollo de los HMA y sus relaciones con la planta hospedadora (Moreira y Siquiera, 2006).

2.5.5 Beneficios de los HMA para las plantas

A las asociaciones micorrícicas se atribuyen la capacidad de aumentar la solubilización de minerales del suelo como Zn, Cu, K, S y N, pero principalmente P, haciéndolos disponibles para la planta hospedera (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995; Newsham *et al.*, 1995), aumenta a su vez la asimilación del agua por la planta en condiciones limitantes, traduciendo así en una mejor tolerancia a estrés abiótico (hídrico, salino, térmico) (Remy *et al.*, 1994; Ruiz-Lozano, *et al.*, 1995). En condiciones de campo, plantas micorrizadas sometidas a estrés hídrico muestran mejores respuestas a irrigación post estrés en producción y biomasa, que plantas no micorrizadas. Los mecanismos asociados al incremento en tolerancia al estrés

hídrico de plantas micorrizadas están relacionados con el incremento en toma de agua por las hifas (Al-Karaki and Al-Raddad), alteración de niveles de hormonas que producen cambios en conductancia estomatal (Drüge y Schönbeck, 1992), incremento en turgencia por reducción del potencial osmótico foliar (Davies et al., 1993), mejoramiento nutricional del hospedero (Johnson y Hummel, 1985) y mejoramiento de la recuperación de la planta después del estrés manteniendo un continuo raíz-suelo (Sweatt y Davies, 1984). Los HMA mejoran también los agregados del suelo debido a la segregación de glomalina, sustancia que actúa como una goma en la profundidad de los suelos formando agregados estables, la glomalina o polisacáridos se adhieren a los micro agregados de suelo, el suelo se vuelve más aireado y poroso (Olalde y Aguilera, 2007; Miller y Jastrow, 2000; Alarcón et al., 2001).

2.5.6 Aplicación de HMA para control de patógenos

Schüßler, et al., (2001) informó que la acción de HMA influye en la diversidad biológica de las plantas y así, en la diversidad biológica terrestre, ayuda controlando parásitos y a la protección de las raíces del hospedero contra patógenos, desplazando de manera eficiente a otros organismos del suelo que pueden causar enfermedades (Hernández-Montiel y Escalona, 2007). Las asociaciones micorrízicas reducen los daños causados por patógenos, especialmente cuando estos son causados por hongos o nemátodos, mejora la resistencia o tolerancia en raíces pero difiere en cada cultivo, no es efectiva para todos los patógenos, la protección de enfermedades es modulada por el suelo y condiciones ambientales, por lo tanto la interacción entre los diferentes hongos y los patógenos de la planta varían con el hospedero y el sistema de cultivo, controlando Oomicetes, como *Phytophthora solanacearum* en eucalipto, *P. parasítica*, *P. capsici* (Ozgonen y Erkilic, 2007; Pozo et al., 2007; Trotta et al., 1996; Akhtar y Siddiqui, 2008) y *P. cinnamomi* en aguacate (Mataré y Hattingh, 1978). Las especies de HMA relacionadas con el control pertenecen a las familias Gigasporaceae, Acaulosporaceae y Glomaceae, que han mostrado controlar el ataque de virus del mosaico amarillo del tabaco, tristeza del cítrico (Lingua et al., 2002; Shaul et al., 1999) nemátodos (Aktar et al., 2008), hongos

como *Fusarium*, *Aphanomyces*, *Rizoctonia* y fitoplasmas controlados por *Glomus intraradices* en árboles de pera (García-Chapa *et al.*, 2004). Las razones por las que se reduce el daño de las enfermedades producidas por patógenos es principalmente por el cambio en la morfología de la raíz, en un incremento de la superficie de la raíz, se observó el incremento de la lignificación en células endodérmicas en tomate y pepino reduciendo el ataque por *Fusarium*, reportándose posteriormente un efecto similar en cebolla (Becker, 1976; Dehne *et al.*, 1978), así mismo estudios histopatológicos de los nódulos en raíces causadas por el nemátodo *Meloidogyne incognita*, mostraron que las plantas micorrizadas tienen menos células grandes, necesarias para el desarrollo de las larvas de nemátodos (Siddiqui, 2008). Cordier *et al.* (1998), demostraron que el control de *Phytophthora* en raíces de tomate micorrizados involucra la inducción de resistencia en células que contienen un arbusculo ya que observaron que dos organismos no colonizan la misma raíz. La diferenciación que hace la planta entre un hongo micorrizógeno arbuscular y un patógeno principalmente es en la respuesta de defensa, ya que al establecerse un hongo micorrizógeno algunas proteínas son sintetizadas sólo localmente y poco acumuladas durante este proceso y regularmente son distribuidas alrededor de la hifa, no así con el desarrollo de la hifa de un patógeno (Siddiqui, 2008).

2.5.7 Adquisición de P

El fósforo (P) es nutriente esencial y es un limitante para el crecimiento de la planta en algunos ambientes o por factores químicos del suelo, el P está presente en el suelo en forma de ortofosfato inorgánico (P_i) y es fácilmente secuestrable por cationes, especialmente en condiciones ácidas, de los cuales los más abundantes son hierro, aluminio y calcio. La movilidad del P secuestrado se reduce y como consecuencia de su absorción la planta agota el P disponible en los alrededores de su sistema radicular y crea una zona de disminución localizada (Bucher, 2007).

El micelio extraradical de los HMA absorbe y transporta elementos de baja difusión como son el fósforo, nitrógeno y otros elementos a considerables distancias de la raíz (Fig. 3) (Bothe *et al.*, 1994; Bago y Azcón-Aguilar, 1997; Clark *et al.*, 1999; Pamiske, 2000).

La absorción de los fosfatos por la planta se lleva a cabo por dos vías, por la vía directa, en ausencia de colonización y por vía indirecta, la cual se realiza cuando la planta está asociada a una simbiosis micorrízica (Smith *et al.*, 2003). Estas dos vías no son complementarias, pero funcionan como alternativas fisiológicas. El principio de la colonización micorrízica resulta en la expresión de transportadores de fosfatos, en donde la adquisición de este por vías de la simbiosis micorrízica arbuscular inicia con la absorción de P_i libre en el suelo por la hifa extraradical, esta hifa fúngica se extiende más allá del sistema radical del hospedero permitiendo incrementar el volumen del suelo explorado para la adquisición de fosfato. Adicionalmente, la colonización micorrízica arbuscular promueve respuestas fisiológicas en el hospedero, tal como la bifurcación de las raíces y la secreción de fosfatasas que promueve indirectamente la absorción de fosfatos, lo cual es mediado por la alta afinidad de transportadores de fosfato (Ezawa *et al.*, 2005; Bennedetto *et al.*, 2005; Sawers *et al.*, 2008). Después de la adquisición por el hongo, el P es transferido a la vacuola del hongo donde es polimerizado para formar cadenas de polifosfatos, estos son traslocados por el compartimento vacuolar a la hifa intrarradical, donde se presume es previamente hidrolizado para su liberación como fosfatos libres dentro del apoplasto interfacial de las células con arbuscúlos (Ohtomo y Saito, 2005; Ezawa *et al.*, 2001; Ferrol *et al.*, 2002) los mecanismos de desdoblamiento de los polifosfatos no han sido caracterizados pero hipotéticamente parecen requerir de una acción de enzimas fosfatasas del hongo, presentes en los arbuscúlos.

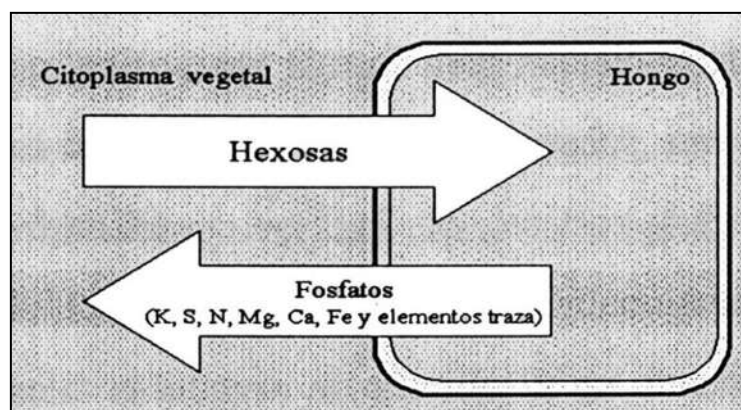


Figura 3. Flujo de nutrimentos entre las células de las plantas y el hongo formador de micorriza arbuscular. El flujo es mediado por transportadores específicos (Tomado de Pamiske, 2000).

Cuando hay niveles altos de P en el suelo, el efecto de la mejoría en el incremento del crecimiento, promovido por los HMA decrece y puede llegar a reprimirse por completo (Tawaraya *et al.*, 1994; Asmah, 1995; Saggin-Junior y Siqueira, 1995), como se ha visto en cítricos, en donde altos niveles de fósforo en plantas micorrizadas pueden reducir hasta en un 19 % su tasa relativa de crecimiento (Rocha *et al.*, 1994; Fonseca *et al.*, 1994; Graham y Eissenstat, 1998).

2.5.8 Adquisición de N

El nitrógeno es un elemento indispensable para el desarrollo de las plantas, y está disponible en el suelo en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), sin embargo, la concentración de amonio en el suelo es más baja que la de nitrato, el nitrógeno es tomado principalmente en forma de amonio cuando las plantas son sujetas a deficiencias de nitrógeno, crecimiento con baja disponibilidad de agua o suelos ácidos. El amonio es de baja movilidad en el suelo y se forma una zona de agotamiento en las cercanías de la raíz de manera muy similar a lo observado con fósforo, el micelio extrarradical de los hongos micorrizógenos puede absorber amonio, nitrato y aminoácidos (Johansen *et al.*, 1997; Govindarajulu *et al.*, 2005), no hay evidencia de traslocación del amonio o nitratos, lo más parecido es que el nitrógeno se trasloca en forma de aminoácido (Bago *et al.*, 2001) debido a que siendo la arginina el aminoácido más abundante en el micelio extrarradical, es la principal forma de traslocación (Peipp *et al.*, 1997), el amonio es primeramente combinado con glutamato para formar glutamina por las enzimas de glutamina/sintasa, habiendo sido traslocada a la hifa intrarradical, la arginina es reducida por ornitina-aminotransferasa y ureasa para liberar amonio (Govindarajulu *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2007). El amonio des-protonado, tiene el potencial para difundirse pasivamente dentro del apoplasto principalmente por gradiente de concentración y alternativamente pueden transportarse también mediante mecanismos proteicos. Los transportadores proteicos encargados de esto aún no han sido esclarecidos, sin embargo, en estudios efectuados en ectomicorrizas, se identificó hipotéticamente que se activaría la traslocación del amonio dentro de las vesículas intracelulares para su subsecuente liberación dentro del apoplasto

interfacial por un mecanismo exocitótico y una vez en el apoplasto, el amonio es potencialmente absorbido directamente por la planta (Sawers *et al.*, 2008).

2.6 Estudios sobre identificación de HMA en rizósfera de aguacate en Michoacán

Diferentes trabajos sobre identificación de especies de HMA en la rizosfera del cultivo en el estado de Michoacán han sido reportados (Bárcenas *et al.*, 2006): Almaraz y Reyes (2007) identificaron 22 especies de HMA presentes en el cultivo del aguacate, en huertos del estado de Michoacán. En 2007 y 2008 se estudió el efecto de mejoradores de suelo sobre la diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares en huertos de aguacate (Bárcenas, 2008) y el impacto del tipo de manejo (orgánico y convencional) sobre la diversidad de estos microorganismos (Aguirre, 2008). Posteriormente, Bárcenas *et al.*, (2009) colectaron suelo de huertos de aguacate ubicados en siete climas en los que se encuentra establecido el 98.6% de los huertos de este cultivo en Michoacán, a partir del cual propagaron e identificaron 49 morfoespecies de HMA de los órdenes: Glomerales, Diversisporales y Archaeosporales, de siete familias y de los siguientes géneros: *Glomus* (9), *Sclerocystis* (5), *Gigaspora* (3), *Scutellospora* (10), *Racocetra* (2), *Acaulospora* (15), *Entrophosphora* (1), *Pacispora* (1), *Archaeospora* (1) y *Ambispora* (2). En 2010 el mismo grupo propagó ocho de esas especies en cultivos monoespecíficos utilizando sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.) como planta trampa (Bárcenas *et al.*, 2010).

Lúa (2011) reportó que las especies *Gigaspora margarita* y *Glomus intraradices* colonizan las raíces de este frutal, predominando *Glomus intraradices*; las especies fueron identificadas mediante biología molecular.

2.7 Aplicación de HMA en aguacate

Vidal *et al.* (1992) reportaron un estudio con plantas de aguacate obtenidas *in vitro*, las cuales presentaron respuesta favorable a la inoculación con *Glomus fasciculatum*

para la aclimatación de plantas *in vitro* ayudándolas a tolerar el estrés ambiental del trasplante. También se sabe que la presencia de HMA incrementa el número de flores por planta y promueve el aumento del peso fresco de la raíz en *Tagetes erecta* y resultados similares se conocen en *Zinnia elegans* (Aboul-Nasr, 1996).

Los primeros estudios reportados en aguacate con HMA son de la variedad “Topa-Topa” en vivero con Menge *et al.* (1980), quienes realizaron inoculación con dos especies de HMA y aplicación de seis dosis de fertilización, reportaron que *Glomus fasciculatum*, incrementó significativamente el porcentaje de N en hojas, P y Cu pero no favoreció la absorción de Ca y Mg y un resultado similar obtuvieron Jaizme-Vega y Azcón (1995) con aguacate generado mediante micropropagación al inocular con *Glomus fasciculatum*.

Silveira *et al.*, (2003) reportaron que utilizando las especies de HMA: *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus manihotis*, *Acaulospora scrobiculata*, *Scutellospora heterógama* y *Gigaspora margarita* para la inoculación de las plántulas al momento del trasplante, efectuando dos meses después el injerto con vareta de la variedad Carmen; *Glomus clarum* promovió mayor altura de planta, con plantas de hasta 30.47 cm de altura siete meses después de injertar; las especies que presentaron mayor influencia en la absorción de nutrientes (P, N, Cu, Zn y Na) y en la acumulación de carbohidratos fueron *Scutellospora heterógama*, *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus etunicatum* y *Glomus clarum*; también observaron, que las plantas colonizadas tuvieron un 98 % más de peso seco para la parte aérea que las plantas testigo y el diámetro del tallo estuvo directamente relacionado con el crecimiento, afirmaron que las plantas tienen afinidad por alguna especie de HMA y estas afectan marcadamente una función específica.

En Colombia Montañez (2009), observó respuesta positiva a la inoculación con HMA nativas de dos géneros en plantas de tres variedades diferentes de aguacate, asociados naturalmente a este cultivo, que fueron aislados y multiplicados bajo condiciones controladas, reportó que las simbiosis con HMA no afecta de manera sustancial el contenido nutricional en las hojas de plantas de aguacate, ya que los incrementos porcentuales en los tratamientos inoculados son muy bajos para

nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio, con respecto a los tratamientos control, pero la inoculación con los géneros *Glomus* sp. y *Acaulospora* sp., favoreció la acumulación de biomasa total de plantas de aguacate en fase de vivero con respecto a los tratamientos control en un 50 % para la variedad Común, en un 48.9 % para la variedad Santana y en un 46.2 % para la variedad Lorena.

Rivera *et al.* (2011) al evaluar el efecto de dos especies eficientes de hongos micorrízicos arbusculares: *Glomus hoi-like* y *Glomus mosseae* sobre indicadores de crecimiento y desarrollo en portainjertos de aguacate con inoculación a la semilla, observaron, incrementos en altura y diámetro de tallo al inocular con *Glomus hoi-like*, estimulando el desarrollo de portainjertos de aguacate en condiciones de vivero con obtención de plantas de mayor calidad y a la vez constituye una alternativa nutricional para el cultivo.

Hernández (2001), en vivero realizó ensayo de inoculación de aguacate raza mexicana (*Persea americana* Mill) con *Glomus intrarradices*, junto con la inoculación se probaron tres tipos de fertilización: fertirrigación tradicional con urea, un fertilizante orgánico (Duetto) y un fertilizante foliar (Auxym). Los tratamientos fertilizados con orgánico se vieron afectados por estrés salino provocado por una alta dosis, lo cual provocó un retardo en el desarrollo de las plantas, traducido en plantas de menor altura, diámetro del tallo, número de hojas, materia seca: aérea y radical. En cambio los tratamientos: control + 40 gr de inóculo y control + 30 gr de inóculo obtuvieron mayores resultados en altura, diámetro del tallo, número de hojas, materia seca aérea y radical, resultaron con los más altos contenidos de N, P, Zn, Cu y Ca foliar pero con bajo contenido de Mn. En cuanto a contenidos de K, Fe, Mg y B se encontraron similares para todos los tratamientos.

Melo (2011), reportó la utilización de plántulas de aguacate cultivar Hass, con tratamientos de tres dosis de micorriza comercial y combinaciones de cuatro sustratos, midió las variables físicas, químicas y biológicas del sustrato, las variables de crecimiento y desarrollo en la planta, encontrando diferencias entre tratamientos los mayores valores para la biomasa microbiana, longitud y diámetro de copa; y patrón 150 días después de la siembra. La mayor colonización de micorrizas se

presentó en el sustrato 20 % compost + 60 % carbonilla + 10 % cascarilla + 10 % bagazo y la mejor respuesta de los HMA se presentó cuando se inocularon 20 g de micorriza comercial.

2.8 Inoculantes

Se define un inoculante como un producto biológico que facilita la introducción de microorganismos con alguna actividad fisiológica que favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas (NOM-021-RECNAT, 2000). El cual puede presentar distintos aspectos físicos: líquidos o sólidos en los que se utilizan acarreadores como la turba, el carbón activado, aceites, alginatos y otros soportes orgánicos e inorgánicos para que el inoculante pueda ser manejado y de esta manera establecer los microorganismos en las hojas, tallo o raíces para establecerlos en los diversos sistemas de producción agrícola, hortícola, frutícola y forestal. En el caso de los hongos micorrízicos, los inoculantes puede consistir en esporas, hifas, fragmentos de cuerpos fructíferos, raíces colonizadas y en su caso suelo rizosférico donde se detecte una abundancia de hifas de hongos micorrízicos provenientes de un sistema de raíz sano (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999).

Los requerimientos que debe cumplir el inóculo antes de implementar su producción y uso a escala comercial son: Idealmente debería ser una mezcla de diferentes especies de hongos adaptadas a las diferentes propiedades del suelo. Esto permite a las inoculaciones ser efectivas en un amplio espectro de condiciones ecológicas. (Gianinazzi y Vosátka, 2004)

2.8.1 Propagación de los HMA

Los HMA necesitan asociarse con una planta que les sirve de huésped para completar su ciclo de vida, la reproducción *in vitro* es compleja y se efectúa mediante cultivos monoxénicos, es decir en un modelo *in vitro* con medios gelificados donde se encuentra creciendo una raíz y una especie de HMA (dos organismos) en cultivo puro (Bago *et al.*, 1998; Hildebrand *et al.*, 2002), la técnica de reproducción común es a través de cultivos trampa seguido de los cultivos monoespecíficos para la obtención de inóculos para uso comercial. La finalidad de los cultivos trampa es

obtener esporas de HMA libres para la identificación, que sirvan como inóculo para establecer cultivos monoespecíficos debido a que las esporas obtenidas directamente del suelo de campo presentan problemas como: (1) presentan apariencia saludables, pero no son viables (algunas persisten como cáscaras muertas durante años o décadas, posiblemente), (2) se pierde o cambia el aspecto de sus características estructurales en respuesta a pigmentos de raíz, química del suelo, temperatura, humedad y la actividad microbiana, y (3) representan sólo aquellos HMA con suficiente actividad y la biomasa para desencadenar la esporulación. Los cultivos trampa dan resultados muy diferentes, en función de los factores bióticos y abióticos que intervienen en el crecimiento, la reproducción y la división de la colonización y esporulación (INVAM, 2012).

2.8.2 Cultivos trampa y monoespecíficos

Para obtener inoculantes de HMA aislados de cultivos establecidos (Calvente *et al.*, 2004), se establecen cultivos trampa estos permiten aislar HMA con mayor adaptación a condiciones edafoclimáticas específicas en donde serán introducidos. También son utilizados, cuando se requiere realizar trabajos de identificación de especies para tener ejemplares jóvenes, libres de infecciones o contaminantes.

La propagación de especies de HMA representa cierto grado complejidad para producir un inóculo en cantidades industriales, debido a que estos microorganismos no son capaces de crecer en ausencia de una planta hospedante, son considerados simbioses obligados. Es común propagarlos con macetas trampa (Sieverding, 1991) mediante la colocación de sus esporas o propágulos en suelo previamente esterilizados y luego sembrar la plántula pregerminada de una planta con capacidad para ser colonizada, luego de tres a cuatro meses, el suelo y raíces de la planta trampa puede utilizarse como inoculante de HMA (Blanco, 1997; Cuenca *et al.*, 2007). La planta trampa debe tener características especiales como: a) compatible obligada y no selectiva a las diferentes especies de HMA, b) adaptarse a un rango amplio de condiciones de suelo y clima, c) de fácil mantenimiento, d) que no requiera mucho espacio, e) puede ser perenne y soportar podas periódicas, f) con alto porcentaje de germinación, g) no debe ser altamente susceptible a enfermedades

comunes con plantas a las que se destine el inóculo (Salas y Blanco, 2000; INVAM, 2010).

En los cultivos trampa para la multiplicación de hongos micorrizícos arbusculares endémicos, se utilizan generalmente gramíneas como el maíz, que es de rápido crecimiento, desarrolla abundante raíz la cual es rápidamente colonizada (Hayman *et al.*, 1976; Owusu-Bennoah y Mosse, 1979; Skipper y Smith, 1979), también el sorgo que es un cultivo de ciclo vegetal corto, tres a cuatro meses, desarrolla abundante raíz que puede ser fácilmente colonizada por los HMA.

Investigaciones respecto al uso de plantas como cultivos trampa: Hamel, (1996) y Brundrett *et al.* (1996) reportan sorgo, maíz, pasto Sudan, pasto Bahía, Andropogon y kudzú (*Pueraria phaseloides*) como cultivos trampa por su rápido crecimiento y multiplicación de esporas. Así mismo, Asano *et al.*, (1997) reportan las especies *Brachiaria decumbens* y *Pueraria phaseloides*; como hospederos que arrojan buenos resultados en la reproducción de esporas. Molina *et al.*, 2006 reportan pasto Raygrass como cultivo trampa alternativo para la multiplicación de hongos micorrizógenos, Brundrett *et al.*, (1996) y Sierverding (1991) recomiendan que el sustrato debe tener una textura arenosa y se puede pasteurizar, también sugieren el uso de vermiculita como componente importante por su aporte de potasio, magnesio, capacidad buffer y no permite que el medio de cultivo se asiente evitando la compactación del mismo; permitiendo así mantener una porosidad apropiada para la ubicación y supervivencia de esporas.

Por otro lado Guerrero (1996) y Dodd y Thompson (1994), reportan que el desarrollo de la micorriza está relacionado con factores abióticos (propiedades físico-químicas del suelo, variaciones climáticas) y factores bióticos como el tipo de comunidad vegetal, condiciones fisiológicas de la planta hospedera e interacciones con otros organismos.

2.8.3 Métodos y formas de aplicación de los Inoculantes

Los hongos micorrizícos pueden ser inoculados en las diversas fases que involucra la propagación de plantas (semillas, estacas, acodos e incluso micropropagación)

tanto en almácigos hortícolas, como en viveros de especies frutales y forestales dependiendo del tipo de inoculante (González-Chávez *et al.*, 1998; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999). La preparación de almácigos y semilleros requiere de la manipulación de poco sustrato, solo para el llenado de los semilleros, la aplicación de inoculante micorrízico es factible de utilizarse en estos sistemas. Es posible mezclar inoculantes peletizados en turba o en cualquier material utilizado como sustrato antes de efectuar la siembra de las semillas. Sin embargo, en el uso de inoculantes en semilleros debe considerarse el tipo de semilla a sembrar ya que semillas de corto período de germinación (especies consideradas como hortalizas) con pocas reservas en sus cotiledones, permite que la simbiosis se establezca en corto tiempo y con ello su efecto benéfico. Cuando se utilizan semillas de largo tiempo de germinación, la viabilidad de los propágulos de los hongos micorrízicos puede ser alterada por el exceso de humedad que se requiere para la germinación. Por otra parte, la mayoría de las plántulas obtenidas por semillas (de plantas de corte arbustivo o leñoso), mantienen por tiempo prolongado sus cotiledones cuyas reservas propician en mayor grado, el crecimiento de las plantas.

2.9 Uso de los HMA nativos en la agricultura

En la agricultura, el uso de HMA tiene un potencial biotecnológico debido a que facilitan la disponibilidad de nutrientes para las plantas. En la actualidad, la degradación del medio ambiente es uno de los problemas más severos que afectan directamente a la producción agrícola; surge entonces el concepto de nuevas prácticas ecológicas, con el propósito de aprovechar y mantener la fertilidad natural del suelo mediante rotación y asociación en policultivos, la recuperación del equilibrio de los minerales del suelo e incluye el uso de microorganismos benéficos como recursos naturales (inóculos nativos) a escala local, favoreciendo así al establecimiento de agroecosistemas de producción sostenida (Guerra, 2008).

Por otro lado, investigaciones recientes concluyen que las plantas micorrizadas poseen una ventaja importante con respecto a las plantas no micorrizadas (Da Silva y Cardoso, 2007; Alarcón *et al.*, 1997; Trejo *et al.*, 2011) sin embargo, el conocimiento sobre las interacciones entre las condiciones edáficas (Serralde y

Ramírez, 2004), la ecología de los HMA nativos así como la efectiva asociación simbiótica entre las plantas y estos microorganismos es limitado (Osorio, 2007). Un análisis de las poblaciones de HMA nativos pueden conducir a su uso eficiente en la agricultura y es altamente probable que la característica de monocultivo en algunos agroecosistemas, esté contribuyendo a reducir la diversidad de HMA en el suelo, lo que estaría causando una selección de HMA con aportes benéficos a las plantas de forma limitada, el uso de pesticidas y los suelos alterados por el hombre para la agricultura, estarían generando diferentes tipos de respuestas de los HMA, desde estimulantes hasta muy poco significantes (Barrera, 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Propagación, identificación, selección e inoculación de HMA

Para realizar la propagación se tomaron muestras de suelo de huertos comerciales en producción de aguacate 'Hass' del estado de Michoacán, México. El desarrollo de la investigación se realizó en los laboratorios de: Interacciones Planta-ambiente, Bromatología, Suelos, así como en el invernadero asignado al Programa de Mejoramiento Genético de Frutillas, ubicados en la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", en la ciudad de Uruapan, Michoacán, México, cuya localización geográfica es 19° 23' 38.8" de latitud Norte, 101° 05' 54.6" de longitud Oeste y una altitud de 1620 msnm (www.michoacan.gob.mx).

3.1.1 Obtención de HMA nativos del cultivo de aguacate

El muestreo de suelo se realizó en dos huertos comerciales de aguacate, con base en reportes de estudios anteriores del grupo de trabajo, seleccionando aquellos huertos donde se había encontrado mayor cantidad y diversidad de HMA; uno ubicado en la localidad de la Basilia, municipio de Uruapan, Mich., y otro en Barranquillas, municipio de Tancítaro, Mich. En cada huerto se seleccionaron 16 árboles con características similares: árboles sanos, de una edad similar y buena producción. Se tomó una submuestra de 2 kg de suelo de la zona de goteo de cada árbol a una profundidad de 30 cm, se juntaron y se mezclaron homogéneamente, para obtener una sola muestra por huerto, que se colocó en bolsas de polietileno con su respectiva etiqueta para llevarlas al laboratorio y preparar macetas para la propagación de esporas de HMA. Previamente, en el laboratorio de suelos, se les determinó pH, textura del suelo y contenido de materia orgánica.

3.1.2 Propagación de HMA en macetas con cultivos trampa

La propagación de esporas se efectuó en macetas con cultivos trampa de acuerdo con los protocolos de Stutz y Morton (1996), que consistió en la mezcla del suelo con arena estéril en relación 3:1 (v:v) para obtener macetas de aproximadamente 2 kg.

La arena fue previamente esterilizada en autoclave a $1.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^2$ de presión. Se obtuvieron dieciocho macetas de cada una de las localidades (la Basilia y Barranquillas), en nueve se estableció sorgo (*Sorgum vulgare* L) y en las otras nueve maíz (*Zea mayz* L.) como cultivos trampa, con la finalidad de que las esporas de los HMA presentes en los diferentes suelos se propagaran. Las macetas se colocaron en invernadero y se regaron cada cuatro días con agua de grifo. Tres meses y medio después, cuando las plantas llegaron a la etapa de floración, se suspendió el riego y se cortó la parte aérea a una altura de 10 cm, una vez secas las plantas, se puso el suelo en bolsas de plástico con su respectiva etiqueta para efectuar la extracción, identificación y conteo de esporas de las especies propagadas.

3.1.3 Extracción de esporas

Para extraer las esporas del suelo de las macetas de propagación, se utilizó el protocolo de tamizado húmedo y decantación propuesto por Gerdemann y Nicolson (1963), seguido de centrifugación en gradiente de sacarosa al 48 % (Walker y Mizew, 1982).

3.1.4 Montaje e identificación de especies de HMA

Las esporas obtenidas se observaron en el microscopio estereoscópico y se separaron en grupos discretos de acuerdo con sus características de color, hifa de sostén y tamaño y se colocó cada grupo en una caja Petri. Aquellas que se encontraban presentes en mayor número, se separaron y se montaron en portaobjetos. Se aplicó una gota de alcohol polivinílico lactoglicerol (PVL) en un lado del portaobjeto y en el otro lado una gota de PVL + reactivo de Melzer y se colocaron los cubreobjetos. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas en posición horizontal, después se examinaron las esporas y se rompieron para permitir su adecuada identificación aplicando una ligera presión sobre el cubre objetos hasta que las esporas se rompieran y las paredes se separaran ligeramente. Se limpió el exceso de medio de montaje con papel ligeramente húmedo con etanol y se colocaron en un horno a 28°C hasta que secaran totalmente.

Las especies se identificaron con el apoyo de la Dra. Lucía Várela Fregoso, mediante observación en microscopio compuesto, se tomaron en cuenta: la forma, tamaño y color de las esporas; grosor, número y ornamentación de las capas de la pared y forma y acoplamiento de la hifa de sostén, teniendo como referencia la Colección Internacional de Hongos Micorrizicos Arbusculares (INVAM por sus siglas en inglés), la descripción de las especies depositadas en el Departamento de Patología de Plantas en Polonia (Blaszkowski, 2003) y las publicaciones originales de las especies (Rothwell y Trappe, 1979; Sieverding y Toro, 1987; Trappe, 1977; Walker y Trappe, 1981; Janos y Trappe, 1982; Wu y Liu, 1995; Gerdeman y Trappe, 1974).

3.1.5 Selección de especies de HMA

Para seleccionar las especies de HMA a utilizar, se tomaron en cuenta: los géneros que han sido observados con mayor frecuencia en suelo de la rizósfera de aguacate (Bárcenas *et al.*, 2009), las reportadas colonizando aguacatero determinadas mediante biología molecular (Lua, 2011) y aquellas que en esta investigación se propagaron en mayor número.

3.1.6 Cuantificación de esporas

Las esporas extraídas se colocaron en cajas Petri con agua destilada, Para facilitar el conteo de esporas, se colocó la caja Petri sobre una cuadrícula que se enumeró vertical y horizontalmente, se observaron al microscopio estereoscópico, registrando el número de esporas de cada especie identificada. El número total de esporas fue referido a 100 g de suelo seco (Ferrera, *et al.*, 2005).

3.1.7 Propagación de los HMA seleccionados en cultivos monoespecíficos

Con la finalidad de contar con suficiente cantidad de esporas recién formadas, sanas y de similar edad para utilizarlas como inóculo para las plantas de aguacate, las esporas de las especies seleccionadas procedentes de los cultivos trampa se propagaron en cultivos monoespecíficos, utilizando sorgo como cultivo trampa, de acuerdo con el protocolo publicado en las páginas del INVAM. 12 días antes de instalar el cultivo monoespecífico, se plantaron 40 semillas de sorgo en una maceta de

15 cm de diámetro, usando un sustrato estéril. A los doce días, se extrajo el cepellón completo, se puso en un recipiente grande lleno de agua y se sumergió totalmente. Las raíces se separaron del suelo, se desenredaron suavemente, se separaron individualmente y se dejaron reposar por lo menos 30 minutos. Las esporas de las especies seleccionadas, se separaron en grupos de 50, para inocular bajo el microscopio estereoscópico de cuatro a seis plántulas de sorgo, que se colocaron en un contenedor cónico, esterilizado, que contenía en el fondo, una capa de arena, después una mezcla de suelo con arena 3:1 y al final (después del establecimiento de la planta inoculada) otra capa de arena (todo esterilizado).

Se establecieron cinco macetas de cada una de las tres especies de HMA seleccionados, las quince macetas se colocaron en el invernadero y se regaron con agua periódicamente cada 4 o 6 días durante 4 meses. Después se cortó la parte aérea de las plantas y se dejó secar por ocho días, luego se colectó el suelo en bolsas de plástico con su respectiva etiqueta y se efectuó la extracción y cuantificación.

3.1.8 Establecimiento de plántulas de aguacate

Se colectaron frutos maduros de un solo árbol de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) en la comunidad de San Ángel Zurumucapio, Municipio de Uruapan, Michoacán. Se seleccionaron 250 frutos con características homogéneas de tamaño y color, a los que se les separó la pulpa de la semilla. Las semillas se lavaron con agua y se dejaron secar durante tres días a temperatura ambiente; antes de sembrarlas se desinfectaron colocándolas en una solución de alcohol al 70 % durante cinco minutos, se enjuagaron con agua estéril, luego se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 15 % por veinte minutos y nuevamente se enjuagaron con agua estéril; después se dejaron secar por doce horas a temperatura ambiente para después sembrarlas.

La siembra se efectuó en el mes de julio utilizando como sustrato una mezcla compuesta por suelo agrícola de la región (topure), arena y materia orgánica (tecata de pino) en relación 3:1:1 (v:v:v), en bolsas de polietileno de 35 x 45 cm con

capacidad de 2 kg. Este sustrato se esterilizó en autoclave con calor húmedo a presión de vapor de 1.5 kg cm^2 , a 121°C , durante una hora por día, durante tres días consecutivos. Se llenaron las bolsas en el invernadero y se colocó una semilla de aguacate por bolsa con sustrato. También se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas del sustrato de acuerdo a la metodología de la Norma Oficial Mexicana 021 (NOM-021-RECNAT, 2000).

3.1.9 Inoculación y manejo de las plántulas de aguacate

Una vez germinadas las plántulas se seleccionaron tomando en cuenta el desarrollo homogéneo de las plántulas. Aproximadamente dos meses después de la germinación las plántulas, se inocularon con las morfoespecies de HMA: *Gigaspora margarita* (T1), *Glomus mosseae* (T2) y *Acaulospora scrobiculata* (T3) y combinaciones de las mismas (T4, T5, T6, T7), manteniendo un testigo absoluto (T8).

La inoculación se realizó descubriendo las raíces de la plántula y colocando las esporas en la mayor cercanía posible a las raíces. Se utilizaron cincuenta esporas de cada morfoespecie de HMA para los tratamientos T1, T2, T3 por planta de aguacate, en los tratamientos donde correspondieron dos morfoespecies (T4, T5, T6), 100 esporas (50:50) y para e T7 tres morfo especies ciento cincuenta esporas (50:50:50).

Antes de que germinaran las semillas se regaron cada tercer día, después de germinadas, el riego se efectuó cada ocho días con agua de grifo. Tres meses después de la inoculación se aplicó el fertilizante foliar Bayfolán $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agua cada dos meses, hasta el mes once. Cuatro meses después de la inoculación se aplicó al sustrato 1.5 g de fosfato diamónico (18 % de N y 46 % de P) a cada plántula con una repetición siete meses después de la inoculación. Para el control de insectos se asperjó cada mes aproximadamente $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de agua de permetrina, hasta los seis meses.

3.2 Variables morfológicas a evaluar en plántulas de aguacate

3.2.1 Porcentaje de colonización

Para la determinación de colonización micorrícica se colectaron raíces jóvenes. Una vez lavadas y secas se procesaron de acuerdo al protocolo de tinción propuesto por Chávez-Bárceñas *et al.* (2013). Para ello, las raíces se secaron a 65 °C por 24 h, posteriormente se colocaron en un frasco, se cubrieron con una solución de KOH 15 % y se mantuvieron en autoclave a 15 lb por 15 min, posteriormente se eliminó el KOH por decantación y se lavaron las raíces con agua corriente, se agregó H₂O₂ al 3 % (agua oxigenada comercial) durante 15 min a temperatura ambiente, se lavó con agua corriente y enseguida se hizo una segunda decoloración con H₂O₂ al 3 % por 20 min, lavándose con agua corriente, para finalmente adicionar HCl 1 %, durante 3 a 5 min. La solución de HCl se eliminó por decantación y sin lavar, se agregó azul de tripano al 0.05% en acetoglicerol (26.66 % ácido acético glacial, 33.33 % glicerol) y se colocaron en autoclave a 15 lb por 10 minutos para fijar el colorante.

Las raíces teñidas se colocaron en porta objetos en grupos de nueve segmentos de raíz, con tres repeticiones de cada muestra, con una gota de PVL-glicerol y se observaron en un microscopio compuestos a 40X y 100X, reportando la presencia de estructuras características de la simbiosis micorrízica (vesículas, arbuscúlos o hifas) presentes en las raíces preparadas. La estimación del porcentaje de colonización se realizó mediante la fórmula de Phillips y Hayman (1970), la cual se describe a continuación:

$$\text{Porcentaje de colonización total} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ de segmentos colonizados})}{\text{N}^{\circ} \text{ de segmentos totales}} * 100$$

3.2.2 Variables de crecimiento de las plantas

Cada mes, a partir de que se efectuó la inoculación, se registraron datos de longitud de tallo (cm), de la base del tallo al inicio del brote terminal, el diámetro de la base del tallo (cm) se midió con un vernier y el número de hojas bien formadas.

3.2.3 Determinación del área foliar y radicular

Estas variables se determinaron trece meses después de la inoculación; para el área foliar se colectó la hoja número cuatro de cada planta y para área de la raíz se utilizó la raíz completa de cada planta una vez lavada con agua. Las hojas y raíces se escanearon con un escáner (HP Scanjet G2410 Flatbed Scanner 1200x1200DPI), la imagen obtenida se analizó con Image Tool versión 3.0 programa de procesamiento y análisis de imágenes, para obtener información y realizar los análisis correspondientes.

3.3 Variables fisiológicas a evaluar en plántulas de aguacate

3.3.1 Biomasa aérea y radicular

Las plantas colectadas para determinar biomasa fueron cortadas a nivel del cuello del tallo y la biomasa fresca de la parte aérea (BFA) y biomasa fresca radicular (BFR) se registraron como el peso en gramos (g) de la parte foliar con tallo y de las raíces, respectivamente. Posteriormente, ambas partes se colocaron en una estufa de secado a 65 °C durante 48 h o hasta peso constante, para obtener el peso seco y referirlo de manera directa así a biomasa seca foliar (BSF) y radicular (BSR) (AOAC, 2000). Los datos fueron ordenados para su análisis.

3.3.2 Relación MSF/MSR

Para el caso de la determinación del índice entra la materia seca foliar (MSF) y materia seca radicular (MSR), se tomaron los datos de cada una de las repeticiones de los tratamientos y se realizó una división entre MSF/MSR, una vez obtenidos los datos fueron concentrados para su análisis.

3.3.3 Contenido de clorofila

Para determinar el contenido de clorofila se utilizó un medidor Spad 502 (Minolta), tomando seis puntos de lectura sobre la lámina foliar de la cuarta hoja, completamente expandida, evitando nervaduras. Las lecturas se registraron a partir del primer mes después de la inoculación.

Para correlacionar las unidades Spad a concentración de clorofila se realizó una curva patrón de correspondencia de unidades Spad con microgramos de clorofila por gramo de tejido fresco. Para lo cual se muestrearon 14 hojas de distintas plantas de aguacate en condiciones de desarrollo similares (cuarta hoja) pero con distintos niveles de coloración, siendo algunas de ellas cloróticas y otras más verdes. Se tomaron seis lecturas de Spad sobre la lámina de la hoja y finalmente se colectó la hoja y se congeló en nitrógeno líquido y posteriormente fueron almacenadas a -70 °C hasta su procesamiento.

La determinación de clorofila se llevó a cabo por el método de Porra *et al.* (1989). Para lo cual las hojas almacenadas fueron pulverizadas con mortero en frío, posteriormente se colectaron tres muestras de 0.01 g del tejido pulverizado de cada hoja en tubos Eppendorf de 1.5 mL. A cada muestra se agregó 1 mL de solución de acetona al 80 %, se mezcló homogenizando en un Vortex Genie-2 Modelo 6560 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York) y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min (en centrífuga Biofuge primo R Heraeus). Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregó 0.5 mL de acetona al 80 % a la pastilla, se homogenizó y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm agregando el sobrenadante al tubo con la primera extracción. La concentración de clorofila total se hizo en referencia al peso fresco de cada muestra, con base en la fórmula de Arnon (1949):

$$\text{Clorofila } (\mu\text{g/g tejido fresco}) = \frac{(\text{Concentración clorofila } \mu\text{g/ml}) \times \text{Vol. extracto (1.5 ml)}}{\text{Peso fresco (g)}}$$

3.3.4 Determinación de Sólidos solubles

Para la determinación de sólidos solubles se colectó la hoja número cinco contada a partir del ápice foliar terminal, la cual se maceró con mortero y pistilo para formar una pasta, la pasta se pasó a través una jeringa haciendo presión para obtener una gota de líquido, la gota se depositó sobre un refractómetro marca Atago modelo N-1a, y se anotó la lectura correspondiente (AOAC, 2000), de cada planta para cada uno de los tratamientos y realizar posteriormente su análisis.

3.3.5 Contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores y almidón.

Para cuantificar el contenido de carbohidratos totales, almidón y azúcares reductores se colectó la hoja número cuatro (Incluyendo el peciolo) de cada una de las plantas, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. Para la extracción se siguió el protocolo de extracción de Rosales y Burns (2011) que consistió en pulverizar en frío usando mortero. Se colectaron cuatro muestras de 0.05 mg del polvo y cada una se depositó en un tubo Eppendor de 1.5 mL para ser procesado de manera independiente. Se agregó 1 mL de agua destilada y se incubó en baño María a ebullición durante 10 min, después se colocó en baño de agua fría con hielo por 3 min, posteriormente se agitó en Vortex Genie-2 Modelo 6560 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York) y se centrifugó a 2500 rpm durante cinco minutos a 5°C (en centrífuga Biofuge primo R Heraeus). A continuación se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y este extracto se utilizó para la determinación de carbohidratos totales, almidón y azúcares reductores.

La cuantificación de azúcares reductores se realizó por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), se basa en la reducción del DNS por la glucosa o cualquier azúcar reductor manifestándose en un cambio de color que puede ser detectado por lectura de absorbancia a 570 nm (Chaplin, 1986). Para lo cual se colectaron 100 μL del extracto y se colocaron en un tubo Eppendor, donde se agregó 1 mL de reactivo DNS (75 g de tartrato de sodio y potasio en 100 mL de agua destilada + 50 mL de NaOH 2M + 75 mL de agua destilada caliente y 0.25 gr de 3-5 dinitrosalicílico) agitó con en Vortex Genie-2 Modelo 6560 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York) y se incubó en baño María a ebullición durante 10 minutos, en seguida se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente para luego tomar lectura de la absorbancia de 570 nm en un espectrofotómetro marca JENWAY UV-visible modelo 6305. Al mismo tiempo se preparó una curva patrón con 0 a 700 μg de Glucosa que fue utilizada para calcular la concentración de azúcares reductores de las muestras por correlación con la absorbancia y sustituyendo en la ecuación de la curva patrón, considerando el factor de dilución y haciendo referencia al peso fresco del tejido utilizado.

Los carbohidratos totales se cuantificaron por medio del método colorimétrico simple del fenol-ácido sulfúrico (Dubois et ál. 1956, BeMiller, 2003) el método detecta todas las clases de hidratos de carbono, el ácido sulfúrico concentrado degrada cualquier polisacárido a monosacárido. Las pentosas son deshidratadas formando compuestos furfural y las hexosas hidroximetilfurfural. A continuación reaccionan con el Fenol produciendo una coloración amarillo-dorada y la absorción se mide a 490 nm. Para ello 100 μL del extracto se colocaron en un tubo limpio y se agregaron 900 μL de agua destilada (dilución 1:10) y se agitó en un Vortex Genie-2 Modelo 6560 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York). Se colocaron 20 μL de esta solución en un tubo de ensaye y se agregaron 180 μL de agua destilada, se homogenizó en vortex y se agregaron 80 μL de fenol al 5 % (Fenol solución acuosa 5 %, Golden Bell), se agitó ligeramente y cuidadosamente se adicionaron 500 μL de ácido sulfúrico, se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Simultáneamente se preparó una curva de calibración con un intervalo de 0 a 100 μg de Glucosa. Una vez frío se agitó con vortex y se tomó la lectura de absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro JENWAY UV-visible modelo 6305. La lectura de absorbancia se sustituyó en la ecuación de la curva de calibración, se multiplicó por el factor de dilución utilizado y se dividió entre el peso del tejido para reportarlo en $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido fresco.

Para la determinación de almidón se tomaron 300 μL del extracto y se colocaron en un tubo Eppendor, se agregaron 900 μL de etanol para precipitar el almidón, luego se agitó con vortex (Genie-2 Modelo 6560 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York)) y se centrifugó (Biofuge primo R, heraus, centrifuge Thermo scientific) a 10 000 rpm durante 10 minutos se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le agregó 1 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente con vortex hasta disolver la patilla completamente. Posteriormente se agregaron 50 μL de una solución de Ioduro de potasio yodurado el cual al reaccionar con el almidón presentó una coloración de amarillo a azul violeta. Se agitó con vortex y se registró la lectura de absorbancia a 594 nm en un espectrofotómetro JENWAY UV-visible modelo 6305. Al mismo tiempo se preparó una curva de calibración con un intervalo de 0 a 200 μg de almidón puro de arroz (Sigma^{MR}). Para calcular el contenido se utilizó la ecuación de la curva en

donde se sustituyó la lectura de la absorbancia para cada muestra, luego se multiplicó por el factor de dilución empleado y se dividió entre el peso de tejido fresco utilizado, reportando la concentración de almidón en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de tejido fresco.

3.3.6 Contenido de nutrimentos

El contenido de nutrimentos se evaluó trece meses después de la inoculación de las plantas con los diferentes tratamientos. El análisis de la parte foliar se realizó con tejido vegetal utilizando hojas completas de la parte media de la planta. Para lo cual se secó el tejido a 65°C por 48 h, posteriormente se pulverizó en mortero y se tamizó a través de una malla de $100 \mu\text{m}$ de apertura. El polvo tamizado se procesó para digestión húmeda para lo cual se colocaron 0.5 g en un matraz aforado de 100 mL, a continuación se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico se mezcló con el tejido seco y se dejó reposar durante 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó en una parrilla eléctrica a 300°C durante 10 min y se permitió enfriar a temperatura ambiente durante 10 min, se agregaron 5 mL de peróxido de hidrógeno y se repitió la incubación a 300°C con la posterior adición de peróxido de hidrógeno en las mismas condiciones durante 3 a 4 veces, hasta observar un color transparente en la solución. Después se agregaron 5 mL de agua destilada y se filtró la solución a través de papel filtro (WhatmanTM 110 mm) y se aforó en un matraz de 25 mL. Esta solución digestada fue utilizada para determinar el contenido de cada elemento como se describe a continuación:

La determinación de N se realizó por colorimetría por medio del método Nessler. Para lo cual se hizo una dilución 1:10 de 1 mL de muestra digestada: en 9 mL de agua destilada; de esta solución se tomó 1 mL, se depositó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se agregaron 25 mL de agua destilada, luego se agregó 1 mL de solución de tartrato de sodio al 10%, después se agregó 1 mL de reactivo de Nessler, se dejó reposar 15 minutos para tomar lectura de absorbancia en espectrofotómetro (UNICO, Modelo UV 2100) a 440 nm (color amarillo). Al mismo tiempo se preparó una curva de calibración con un intervalo de 0 a 100 ppm de NH_4 .

El contenido de P se determinó por colorimetría, se tomó 1 mL de la solución digestada y se depositó en un matraz aforado de 50 mL donde se mezcló con 1 mL de una solución de molibdato de amonio con ácido ascórbico (0.05 g de ácido ascórbico + molibdato de amonio $((\text{NH}_4)_4 \text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$, luego se aforó con agua destilada a 50 mL, se mantuvo a temperatura ambiente 30 minutos y se registró la lectura de absorbancia a 825 nm en espectrofotómetro (UNICO, Modelo UV 2100). Al mismo tiempo se preparó una curva de calibración con un intervalo de 0 a 10 ppm de fósforo, correlacionando con la absorbancia obtenida.

El resto de la solución digestada, se envió a CICLUS, laboratorio de diagnóstico vegetal para la determinación del K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu y B.

El contenido de los elementos se obtuvieron para N, P, K, Ca, y Mg en % y Fe, Mn, Zn, Cu, B en mg kg^{-1} . Pero para los resultados se refirió al promedio de peso seco de hojas como $\text{mg de nutriente hoja}^{-1}$. Asimismo se calculó respecto al área foliar y se reportó como microgramos de nutriente por cm^2 .

3.4 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente azar, con ocho tratamientos. La unidad experimental representada por una planta, con 6 repeticiones, haciendo un total de 48 unidades experimentales, como se muestra en la Figura 4.

T8R ₁	T4R ₅	T7R ₂	T8R ₆	T2R ₄	T7R ₁	T3R ₅	T6R ₂
T2R ₅	T6R ₆	T1R ₅	T3R ₆	T1R ₁	T5R ₁	T8R ₂	T2R ₆
T7R ₃	T8R ₅	T4R ₃	T5R ₄	T2R ₃	T4R ₁	T5R ₆	T3R ₁
T1R ₄	T5R ₃	T6R ₃	T7R ₆	T6R ₅	T8R ₄	T6R ₁	T4R ₄
T4R ₆	T3R ₂	T8R ₃	T1R ₆	T5R ₅	T7R ₅	T4R ₂	T7R ₄
T6R ₄	T1R ₃	T2R ₁	T5R ₂	T3R ₃	T2R ₂	T3R ₄	T1R ₂

Figura 4. Esquema representativo de ubicación los tratamientos en el invernadero. Especies de HMA: Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo). Repeticiones: R1, R2, R3, R4, R5, R6.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos y organizados se sometieron a un Análisis de Varianza (Prueba de Fisher), bajo el esquema del modelo del diseño experimental completamente al azar. Cuando se encontró significancia estadística se procedió a realizar la comparación de medias, a través de la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Propagación, identificación, selección, cuantificación e inoculación de HMA

4.1.1 Selección de las especies propagadas

En las macetas de propagación con maíz y sorgo como cultivos trampa, se propagaron varias especies, pero destacaron en número: *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae* y *Acaulospora scrobiculata*, que coincidieron con aquellas que habían sido encontradas con mayor frecuencia en suelo de la rizósfera de aguacate: Bárcenas *et al.* (2006) en una recopilación de trabajos realizados sobre HMA en aguacate en el estado de Michoacán hasta el 2006, reportaron que los hongos más comunes encontrados fueron: *Gl. geosporum*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *Gl. rubiformis*, *S. verrucosa* y *Gigaspora* sp.; Bárcenas *et al.* (2011) al realizar la propagación de HMA en macetas utilizando maíz como cultivo trampa, con suelo colectado de huertos de aguacate ubicados en siete climas diferentes, detectaron e identificaron 49 morfoespecies de HMA de los siguientes géneros: *Acaulospora* (15), *Ambispora* (2), *Archaeospora* (1), *Entrophosphora* (1), *Gigaspora* (3), *Glomus* (9), *Pacispora* (1), *Racocetra* (2), *Sclerocystis* (5) y *Scutellospora* (10); *Glomus mosseae*, se encontró en el 70 % de los huertos. Lua (2011) identificó por secuenciación de DNA a *Gigaspora margarita* colonizando raíces de aguacatero.

Con base en lo anterior, se decidió que *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae* y *Acaulospora scrobiculata* fueran las especies seleccionadas para inocular las plántulas de aguacate.

Cuadro 2. Principales características de las morfoespecies de HMA propagadas, identificadas y seleccionadas para usarse como inóculo en plántulas de aguacate.

Nombre de la especie	Color	Diámetro (µm)	Observaciones
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	Transparente a hialino	90 a 110	Ornamentación de la pared
<i>Glomus moseae</i>	Amarillo claro a amarillo oscuro	200 a 280	Hifa
<i>Gigaspora margarita</i>	Blanco brillante	290 a 360	Hifa Globosa Reacción al melzer

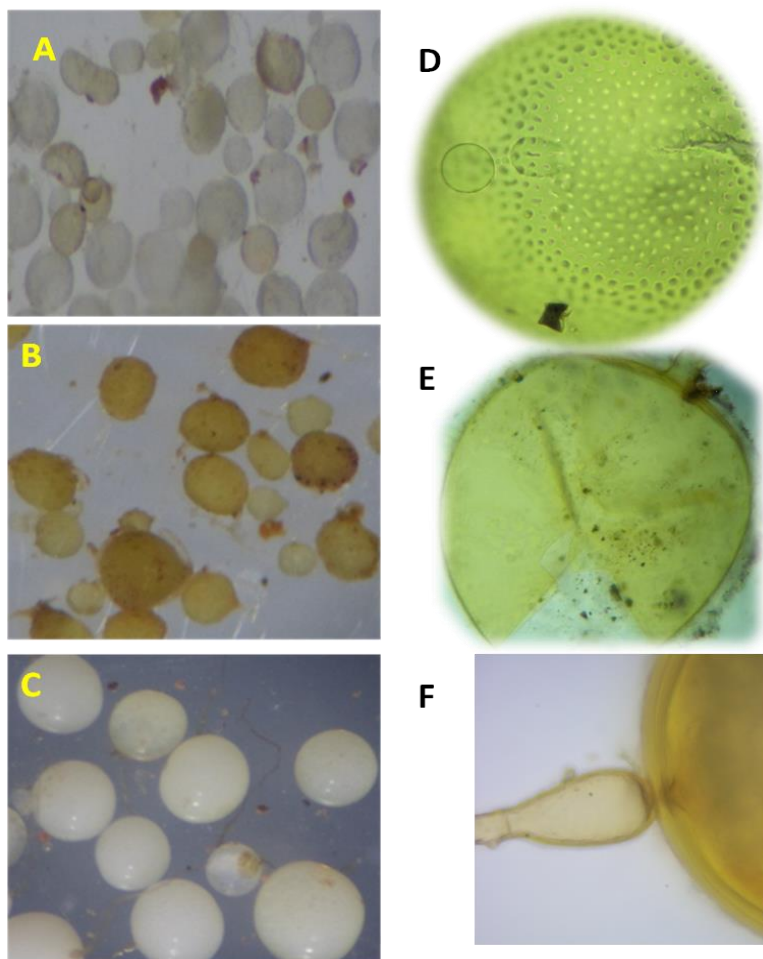


Figura 4. Esporas identificadas y seleccionadas. A, B, C Vista al microscopio estereoscopio con luz reflejada. D, E, F. Vista al microscopio compuesto a 40X. A y D *A. scrobiculata*, B y E *G. mosseae*, C y F *G. margarita*.

La determinación de utilizar especies nativas provenientes de huertos de aguacatero de la región, para ser probadas como inóculo en plántulas de aguacate, se basó en los reportes de investigadores como Smith y Read (2008) que mencionan que las poblaciones naturales de hongos micorrízicos son a veces insuficientes o ineficientes para que se dé una buena simbiosis, lo que afecta negativamente al desarrollo de los cultivos, es por ello que se pueden incrementar estos hongos mediante la producción de inóculos nativos de un determinado suelo, o también aplicar hongos que, sin ser nativos, han resultado ser eficientes y competitivos, a lo que Tapia (2003) argumenta que de estas dos prácticas, se prefiere el manejo agro cultural de los hongos nativos y no la introducción de hongos exóticos, pues estos últimos no están adaptados a las

condiciones edáficas de un ecosistema en particular y Montañó *et al.* (2007), afirma que pueden ser más eficientes los inóculos mixtos dada la sinergia que se establece entre las especies.

4.1.2 Cuantificación de esporas

Número de esporas de HMA por localidad. El número de esporas de HMA fueron diferentes en los suelos de las dos localidades; se encontró un mayor número en el suelo pocedente de la localidad de Tancítaro que en La Basilia (**Figura 5**).

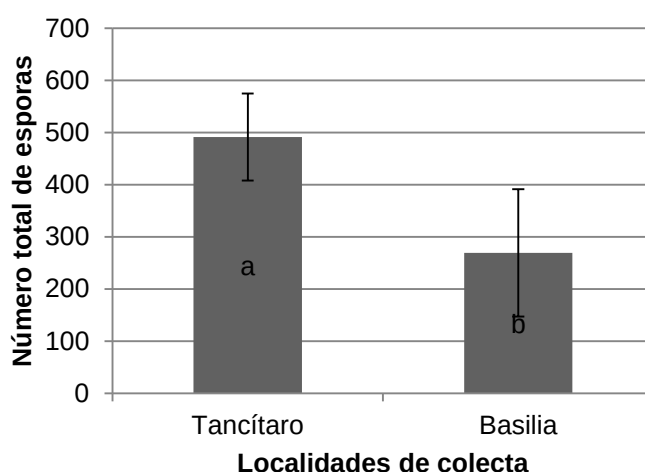


Figura 5. Número de esporas de HMA por localidad propagadas en macetas con cultivos trampa (maíz y sorgo)

La diferente cantidad de esporas pudo ser influida por las características del suelo como pH y contenido de materia orgánica, ya que los suelos de la localidad de la Basilia tuvieron un pH de 6.4 y 2.08 % de materia orgánica y los de Tancítaro un pH de 6.2, con 2.9 % de materia orgánica, ambos con textura Franco Arenosa, el último tiene un menor pH pero mayor cantidad de materia orgánica. Esto coincide con lo afirmado por Alcalá *et al.* (2001), en el sentido de que en la mayoría de los horizontes superficiales la MO influye en el pH con acidez moderada (4.9 a 6.9), del mismo modo Cruz y Geissert (2000) señalan que los valores más ácidos en los horizontes superficiales se deben al mayor contenido de materia orgánica, que con sus grupos funcionales provocan la disminución del pH del suelo. En cuanto a la cantidad de

esporas, Aguirre *et al.* (2009) y Bárcenas *et al.* (2010) encontraron que la materia orgánica tuvo una correlación positiva con la densidad de esporas de HMA.

Número de esporas por localidad por especie de cultivo trampa. Cuando se comparó el número de esporas propagadas en cada localidad por cultivo trampa, se encontró que sólo se presentó diferencia significativa entre las propagadas en suelo de Tancítaro con sorgo y aquellas que se propagaron en suelo de La Basilia con maíz como cultivo trampa (Figura 6). En cambio cuando se analizaron exclusivamente las diferencias entre las especies de cultivos trampa, sin considerar las localidades, no se encontraron diferencias estadísticas significativas, lo cuál indica que el número de esporas propagadas es igual al utilizar sorgo o maíz.

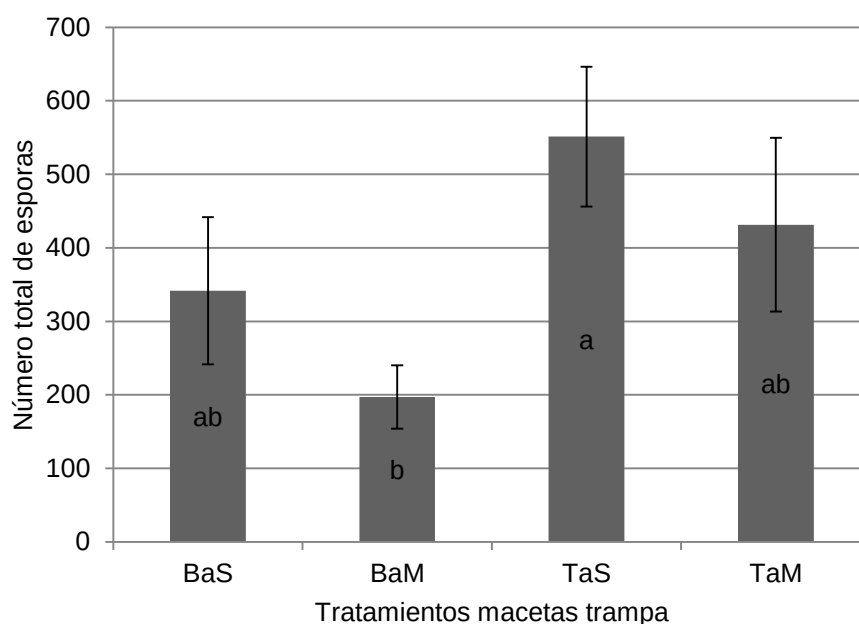


Figura 6. Número de esporas de HMA por localidad propagadas en macetas por cultivo trampa

Número de esporas de HMA de cada especie propagadas en macetas trampa por localidad y cultivo trampa. Al hacer esta comparación, sólo se encontraron diferencias significativas para la especie *A. scrobiculata*, la cual se propagó mejor en suelos de Tancítaro (Figura 7), que como se mencionó en párrafos anteriores, tiene un pH más bajo que La Basilia, lo que puede explicarse con lo encontrado con Bárcenas (2008) con respecto a las especies *A. scrobiculata* y *A. spinosa* que

presentaron una correlación significativa y altamente significativa respectivamente con respecto al pH y con González (2005), quien determinó que *A. scrobiculata* prefiere sitios con concentraciones de MO media y pH moderadamente ácido (5.6 - 6.0), así como las afirmaciones de Hass y Menge (1990), en el sentido de que las especies del género *Acaulospora* son afines a suelos ácidos.

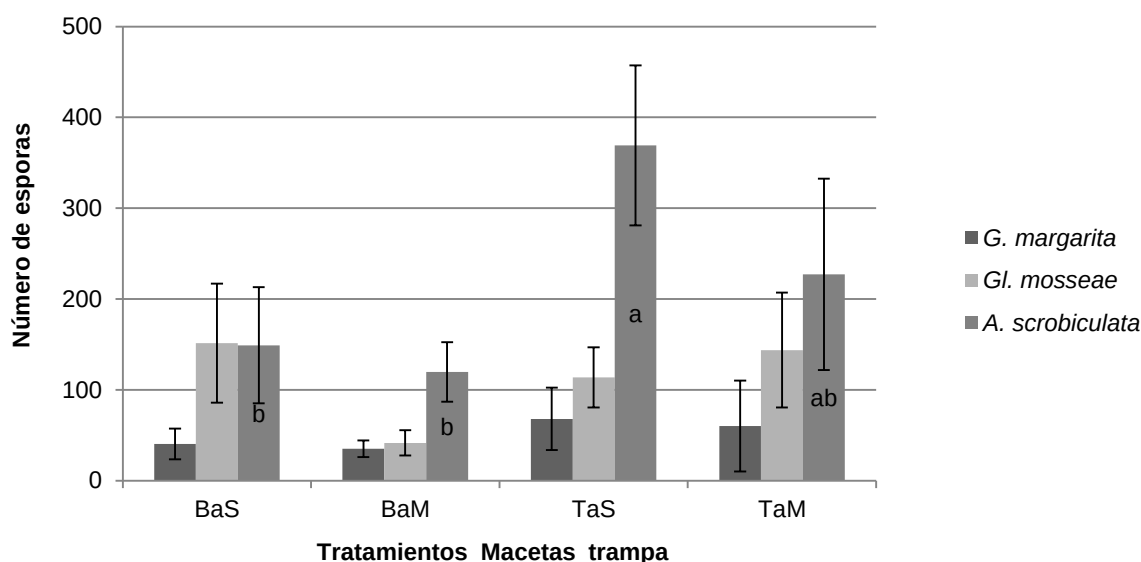


Figura 7. Número de esporas propagadas en macetas trampa. BaS = suelo de La Basilia con sorgo, BaM = suelo de La Basilia con maíz; TaS = suelo de Tancítaro con sorgo y TaM = suelo de Tancítaro con maíz.

Número de esporas de cada una de las especie de HMA propagadas en cultivos trampa. La especie más abundante fue *A. scrobiculata* (Fig. 8), con diferencia significativa respecto a las otras dos especies, esta especie había sido reportada desde 1990, por Hass y Mengue, en huertos de aguacate de California y en estudios efectuados en Michoacán (Bárcenas *et al.*, 2006; Aguirre *et al.*, 2007; Bárcenas, 2008 y González *et al.*, 2012).

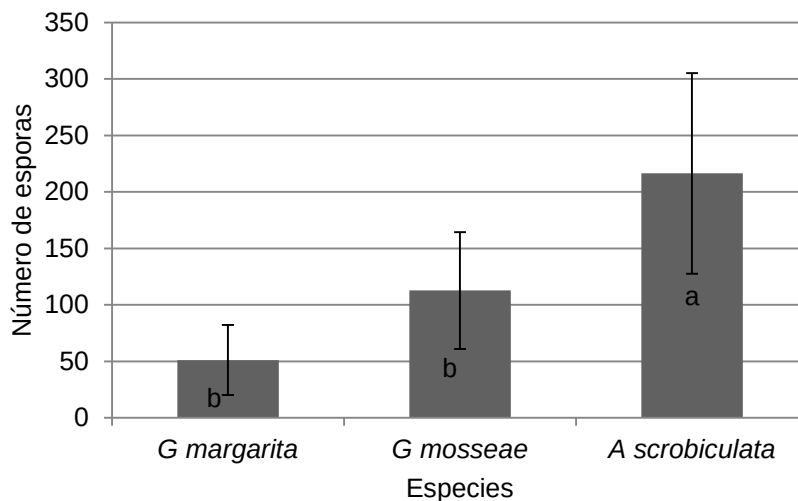


Figura 8. Número de esporas de HMA propagadas de cada una de las especie de HMA en cultivos trampa.

4.1.3 Cultivos mono específicos

Los resultados para los cultivos monoespecíficos de las tres especies de HMA seleccionadas a partir de los cultivos trampa en las condiciones descritas fueron estadísticamente significativos (Figura 5) se cuantificaron para *Acaulospora scrobiculata*: 2627, por cada 100 gr. de suelo seco, *Gigaspora margarita*: 771 esporas por cada 100 g de suelo seco y *Glomus mosseae*, 255 esporas por 100 g. de suelo seco.

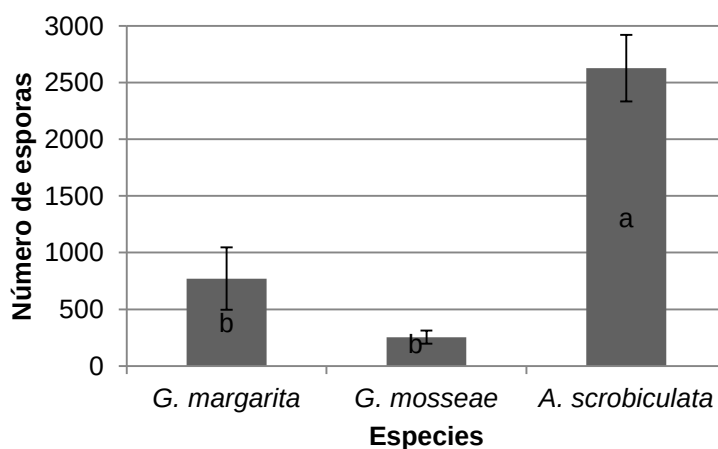


Figura 5. Número de esporas de cada una de las especies de HMA propagadas en cultivo monoespecífico.

4.2 Efecto de la inoculación de HMA sobre la morfología de plantas de aguacate

4.2.1 Características del sustrato utilizado para germinación de plántulas de aguacate

Las características químicas del sustrato utilizado para la germinación de las plántulas de aguacate criollo (Cuadro 3) fueron: un pH 6.4; materia orgánica 2.8 %; fósforo 13 mg·Kg⁻¹; con una textura de suelo franco arenosa, estas características son similares a las reportadas en huertos comerciales de aguacate, el pH óptimo es de 5.5 a 6.5 ya que valores arriba de 8 y menores de 4.5 son valores extremos ya que la productividad podría bajar significativamente (Salazar, 2002; Wolstenholme, 2002).

Cuadro 3. Análisis físico-químico del sustrato. Resultados del análisis del sustrato utilizado en el experimento.

Suelo	pH (H ₂ O)	N		P- Bray		K	MO	Conductividad Eléctrica mnhos cm ⁻¹	Fracción mineral (< 2mm)		
		mg suelo ⁻¹	kg	mg/kg suelo ⁻¹	%				Arcilla %	Limo %	Arena %
	6.47	24		13		0.31	2.8	0.21	5.28	25.28	69.4
In.	Ligeramente Ácido	Medio		Bajo		Alto	Muy bajo		Textura Franco arenosa		

4.2.2 Porcentaje de colonización

El porcentaje de colonización micorrícica evaluado al finalizar el experimento, es decir 13 meses después de la inoculación, mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Los tratamientos con mayor porcentaje de colonización fueron el T3 (*A. scrobiculata*) con 72.8 % y el T1 (*Gi. margarita*) con 65.5 %, seguidos por el T7 (*Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*) con 53.1 %, el resto de los tratamientos no mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellos, mientras que el testigo (T8) mostró 0.86 % de colonización (Figura 6). Esto sugiere que *A. scrobiculata* y *G. margarita* forman una

asociación micorrícica más estable con aguacate que la asociación dada con *Gl. mosseae*, esta diferencia en el nivel de colonización de plantas por diferentes especies de HMA se ha observado anteriormente y se ha referido como una “preferencia de hospedero” por parte de distintos HMA, asimismo se ha visto como la influencia de la presencia de una especie sobre la densidad observada de otra al ser co-inoculados (Alkan *et al.*, 2006). También corresponden con los resultados de Tavasolee *et al.* (2011), quienes al co-inocular plantas de garbanzo con dos especies de HMA en igualdad de potenciales de infección observaron que la densidad relativa, cuantificada por qRT-PCR, mostró una mayor ocupación de *G. intraradices* respecto a *G. mosseae* en raíces. Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con lo reportado por Montañez *et al.* (2010), quienes aislaron esporas de dos especies de HMA de suelos de huertos de aguacate en Colombia, los cuales utilizaron para inocular plantas de vivero y encontraron un porcentaje mayor de colonización en las plantas de aguacate al inocularlas con *Acaulospora* (82.50 %) que al hacerlo con *Glomus* (77.36 %). Asimismo se sustenta que la colonización es regulada en parte por la compatibilidad de los HMA con las especies vegetales (Read, 2002).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo se contraponen con lo observado anteriormente en huertos de aguacate de la región de Michoacán, en donde se comparó el uso de distintos mejoradores de suelo respecto a la riqueza y abundancia de especies de esporas de hongos micorrizógenos en suelos (Bárcenas-Ortega *et al.*, 2010). En este estudio se reportó una abundancia relativa de esporas del género *A. spinosa* (29 %) similar a otras tres especies del género *Glomus* (20 %), pero el género *Gigaspora* fue el menos representativo con densidades menores al 2%. Es importante señalar que este último trabajo refleja la capacidad de formación de esporas y no la capacidad de formación de estructuras intraradicales, como en el presente estudio, por lo que el fenómeno fisiológico puede ser distinto. Considerando esto último se sugiere que el género *Gigaspora* tiene una alta capacidad de formar estructuras micorrícicas intraradicales pero no forma estructuras de resistencia.

Otro resultado observado en el presente trabajo fue que a pesar de que los tratamientos que incluyeron consorcios contenían un mayor número de esporas (2 y 3 veces más) el nivel de colonización de *A. scrobiculata* y *Gl. mosseae* es superior cuando las plantas de aguacate fueron inoculados en forma independiente por las HMA. Resultados similares se reportaron en raíces de garbanzo al ser inoculadas con *G. intraradices* y *G. mosseae*; el porcentaje de colonización micorrícica fue mayor en las raíces al ser inoculadas con cualquiera de las dos especies en forma independiente, que al ser co-inoculadas, concluyendo que podría deberse a competencia entre los distintos HMA y las plantas por fuentes de carbono (C) y que la partición de C en la planta puede inducir auto-regulación de simbiosis (Tavasolee *et al.*, 2011).

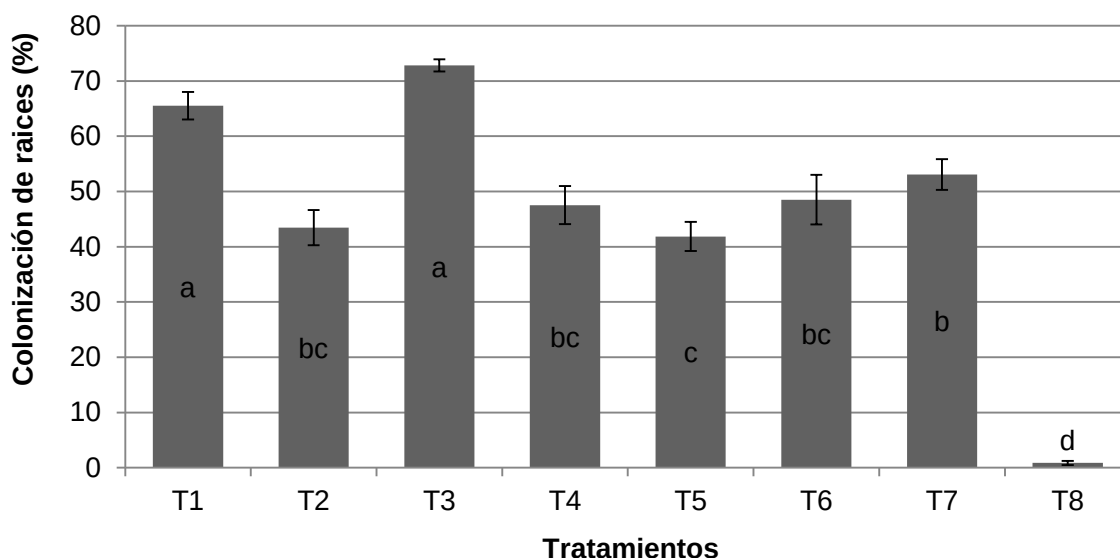


Figura 6. Porcentaje de colonización. Promedio del porcentaje de colonización de plántulas de aguacate trece meses después de la inoculación con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

4.2.3 Altura de plantas

La altura se midió mensualmente a partir del primer mes después de la inoculación con HMA (Enero de 2012), está constituye de manera práctica un parámetro indicador para determinar la calidad de las plantas. Se analizó como incremento de altura, la que se obtuvo por diferencia de altura al momento de inocular (Diciembre 2011) y la altura del último mes a evaluar (**Figura 7**)

Durante los primeros tres meses después de la inoculación los tratamientos presentaron un incremento de altura mensual promedio de 3 cm, pero sin diferencias estadísticas significativas, lo que indica que el efecto de la inoculación con HMA aún no refleja respuesta sobre la altura de la planta. Este incremento pudo ser debido a las reservas de la semilla y genética de las plantas ya que las plantas con semillas grandes, obtienen su alimento durante los primeros meses de vida, exclusivamente de las reservas en su semilla, debido a las condiciones (de su origen) en que evolucionó y a su tamaño cuentan con mayor cantidad de recursos para iniciar su crecimiento y establecimiento en lugares con escasez de recursos, por ejemplo en la sombra de los bosques, ya que producen plántulas más grandes y resistentes, con mayor superficie de raíces y de hojas (Whiley *et al.*, 2002).

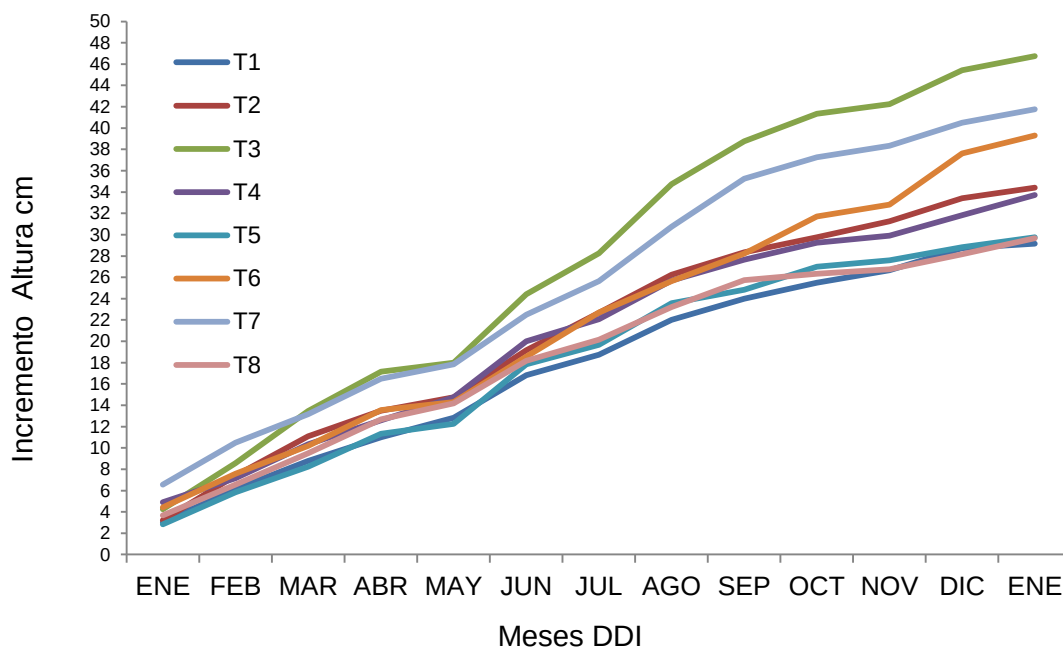


Figura 7. Promedio de incremento de altura. Representación gráfica mensual de las observaciones de tratamientos de plantas inoculadas con HMA, después de la inoculación durante los meses evaluados. T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Al cuarto mes se observó un incremento general en altura de 1.5 cm, es en este mes, cuando las plantas inoculadas con *A. scrobiculata* (T3) empiezan a despegarse de las demás, al igual que las que se inocularon con el consorcio de las tres especies (T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*), condición que se siguió observando en el mes cinco y hasta el final, pero es hasta el mes seis (junio), en que las diferencias estadísticas son significativas (Figura 10), siempre destacando la especie *A. scrobiculata*, lo que indica que la inoculación con esta especie puede estar mayormente adaptada al reconocimiento temprano planta-hongo y a su efecto sobre el crecimiento de la planta. A partir del mes 11, el T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, empieza también a destacar y a separarse de los otros tratamientos. Lo anterior coincide con Rivera *et al.* (2011) Quien reportó un incremento significativo en altura para plantas con inoculación de HMA respecto a las no inoculadas, a los 6 y 7 meses de edad de las plantas. De igual forma Alarcón y Ferrera-Cerrato, (2003) reportan incremento en el crecimiento

de las plántulas de aguacate inoculadas con HMA a los siete meses después de la inoculación.

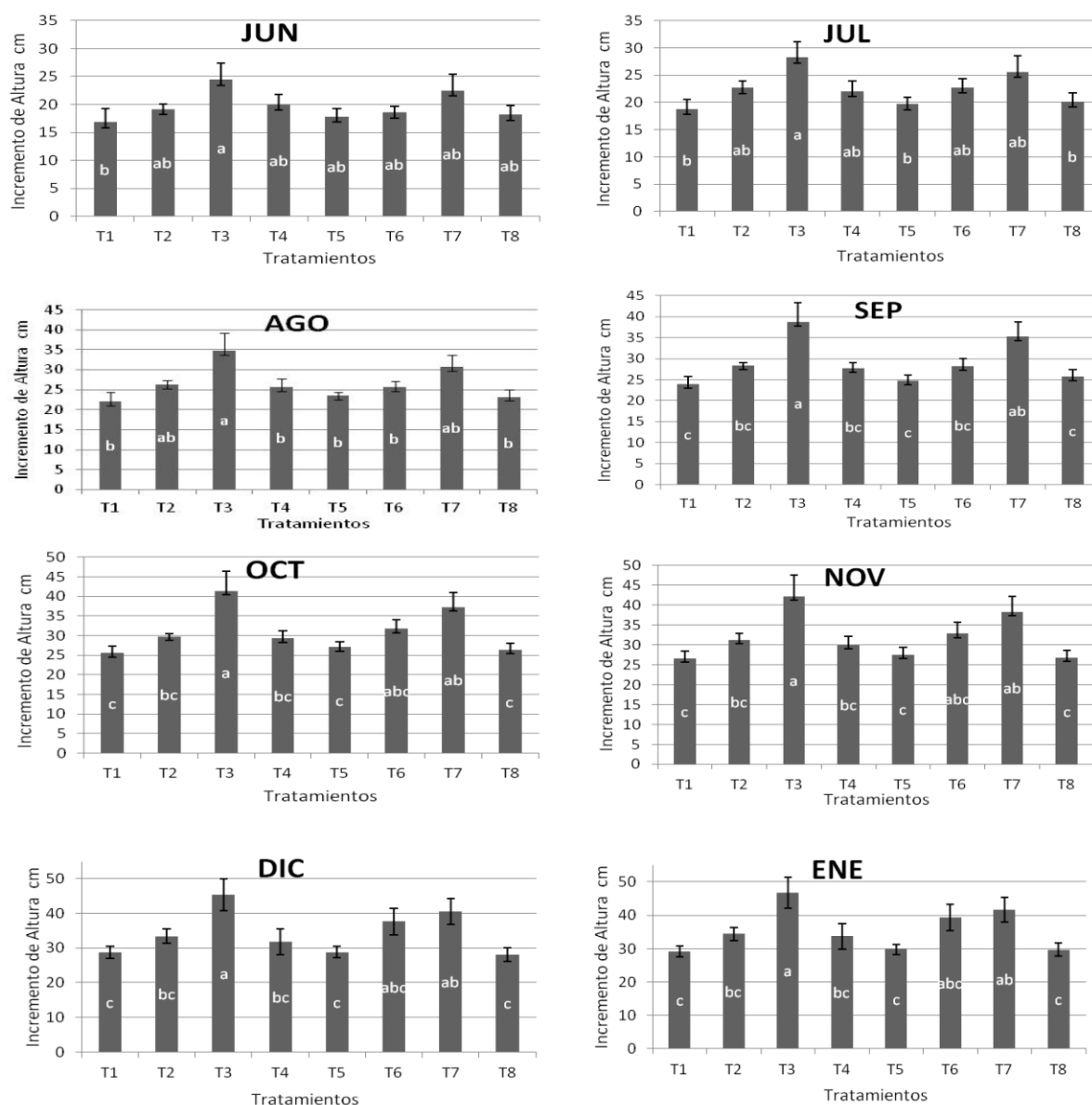


Figura 10. Representación gráfica del incremento de altura. Promedio en cm de plantas de aguacate inoculadas con de HMA, seis (JUN) meses después de la inoculación. Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Esto revela que el efecto de los HMA sobre las plantas de aguacate para el incremento en altura es evidente después de 6 meses de la inoculación con *A. scrobiculata*, a los nueve meses todos los tratamientos a excepción del T1 = *Gigaspora margarita*, superaron al testigo, destacando al final el efecto de *A. scrobiculata* (T3) y del consorcio de las tres especies (T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*), lo que indica la influencia de esta simbiosis sobre el crecimiento de las plantas de aguacate (Figura 13). Esto puede argumentarse porque en el aguacatero, la eficiencia de las raíces podría estar limitada por la carencia de pelos absorbentes y el empleo de micorrizas, constituye una alternativa para mejorar su desarrollo.



Figura 11. Altura de las plantas de aguacate inoculadas con de HMA. Trece meses después de la inoculación. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Montañez, (2009) reporta que los promedios mayores para crecimiento de la planta de aguacate se presentaron al inocular las plantas de aguacate con HMA aislados de la rizósfera de aguacate provenientes del suelo de Puerto Colombia, sin observar

diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación con *Glomus* y *Acaulospora*, pero si entre estos y el tratamiento control. También, Reyes *et al.* (1998), reportaron que la altura de las plantas fue favorecida por la inoculación de hongos micorrizógenos, observándose diferencias con respecto al testigo. Menge *et al.* (1978) y Vidal *et al.* (1992) también constataron, en aguacatero, mayor altura de la parte aérea en plantas inoculadas con HMA y confirmaron que la utilización de plantas previamente sometidas a inoculación con HMA, permite el establecimiento y desarrollo más rápido de las plantas de aguacate en vivero y en campo (Menge *et al.*, 1980; Silva y Siqueira, 1991).

4.2.4 Diámetro del tallo

El diámetro es un parámetro que permite conocer el vigor de la planta, las observaciones mensuales durante trece meses de los tratamientos inoculados con HMA, iniciando un mes después de la Inoculación, indicaron que en los primeros ocho meses después de la inoculación no se observaron diferencias estadísticas significativas. Lo que concuerda con Alarcón y Ferrera- Cerrato, (1999) que las diferencias en frutales se observan después de varios meses, debido a que las plantulas dependen de reservas en sus semillas (Vázquez *et al.*, 1997, Raven, *et al.*, 1992)

Nueve meses después de la inoculación, se presentaron diferencias significativas de todos los tratamientos, con respecto a T1 = *Gigaspora margarita*, lo mismo ocurrió en el mes 10 y 11; fue hasta el mes 12, cuando destacan con diferencias significativas y mayor promedio los mismos tratamientos que sobresalieron en altura de tallo: T3 = *Acaulospora scrobiculata*, el consorcio de las tres especies T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulopsora scrobiculata* y T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* (

Fig. 12 y 13). Al respecto, Alarcón *et al.* (2003) reportaron que la inoculación con HMA en plántulas de naranja presentaron incremento significativo en este parámetro, respecto a las no inoculadas. Cabe mencionar que las plantas inoculadas con

Gigaspora margarita presentaron menor diámetro, incluso por debajo de las plantas testigo.

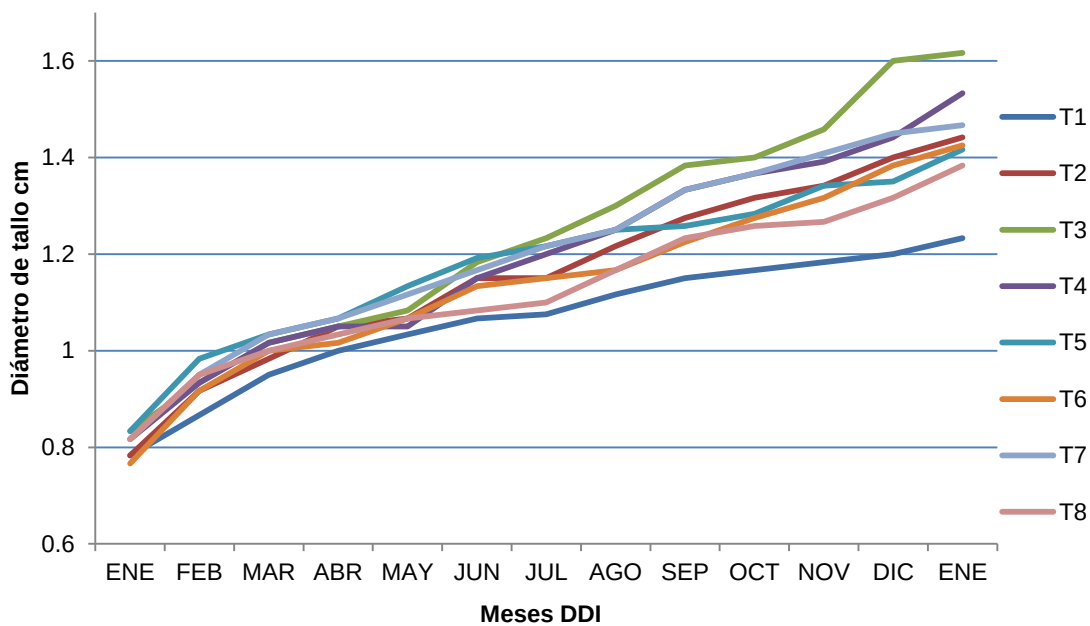


Figura 12. Representación mensual gráfica del diámetro de tallo. Promedio de las plantas de aguacate inoculadas con HMA aislados de la rizósfera del aguacate. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).



Figura 13. Comparación del diámetro después de trece meses de la inoculación. Comparación mensual de los tratamientos después de la inoculación. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

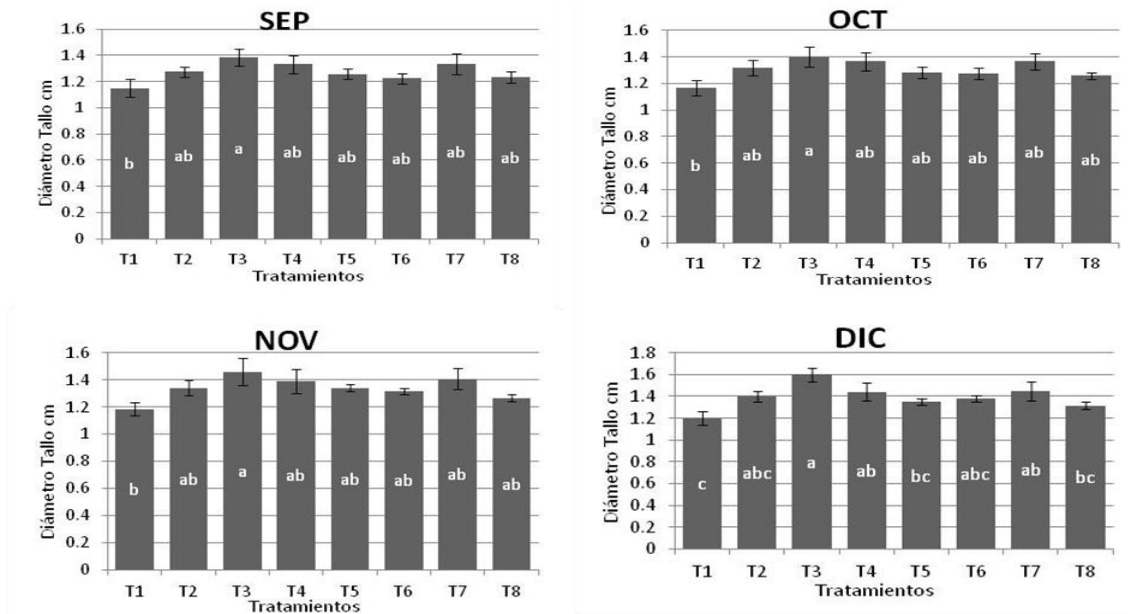


Figura 14. Promedios de diámetro del tallo de las plantas inoculadas con HMA. A 9 (SEP), 10 (OCT), 11 (NOV) y 12 (DIC) meses después de la inoculación. Valores de las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

4.2.5 Número de hojas

Las hojas juegan un papel importante para proveer de energía a la planta y así desarrollar sus funciones metabólicas. Desde la apertura de la yema, la expansión total de una hoja de aguacate puede tomar cerca de 65 días. En las plantas inoculadas con HMA, no se encontraron diferencias estadísticas significativas para número de hojas, pero puede observarse a partir del tercer mes después de la inoculación mayor número de hojas en el tratamiento inoculado con *A. scrobiculata* (Figura 15), además mantiene el mayor promedio a partir del cuarto mes después de la inoculación durante las observaciones realizadas.

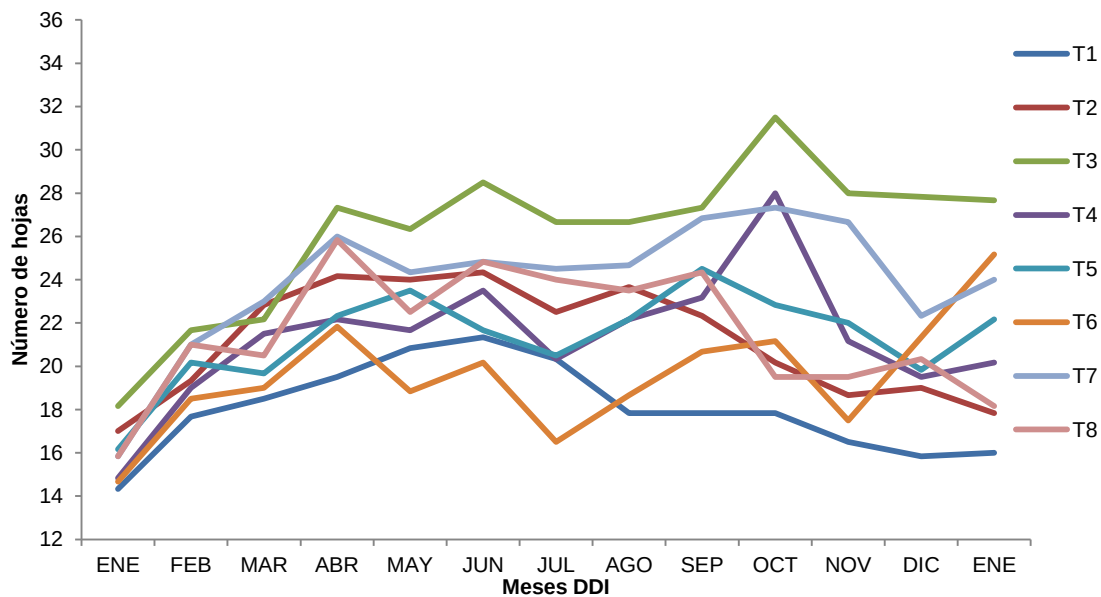


Figura 15. Promedio de número de hojas. Representación de las observaciones mensuales después de la inoculación con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Lo anterior coincide con Rivera *et al.* (2011) quien, reportó que no se presentó diferencia significativa para número de hojas a los 200 días de edad en plantas de aguacate inoculadas con *Glomus hoi-like* y *Glomus mosseae*. Esto podría deberse a que las hojas son órganos que presentan abscisión, resultado de procesos bioquímicos y celulares por lo que la cantidad de hojas podría depender de la genética propia de cada planta. Además en el aguacate las hojas tienen un ciclo de vida de 10 a 12 meses, esto es un tiempo de vida relativamente corto comparado con otros árboles frutales como mango y cítricos (Liu *et al.*, 2002; Mandemaker, 2007a). Aunque las hojas viejas juegan un papel fuerte en el suministro de carbohidratos, el exceso de sombra por las hojas nuevas disminuye su producción (Mandemaker, 2007b). De acuerdo con Liu *et al.* (1999) cuando las hojas nuevas están completamente expandidas y alcanzan su pico máximo de actividad fotosintética, las hojas viejas del ciclo anterior disminuyen su capacidad fotosintética hasta el 40% y se presenta cerca del 60% de la abscisión de estas.

4.2.6 Área Foliar

Para área foliar analizada trece meses después de la inoculación con HMA, se observó diferencia estadística significativa, sólo entre los tratamientos T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T1 = *Gigaspora margarita*, todos los demás fueron estadísticamente iguales, incluido el testigo (Figura 6), lo que concuerda con Vidal *et al.* (1992) que al determinar el área foliar de portainjertos de aguacatero, reportaron que en los tratamientos inoculados con *S. heterógama*, *G. etunicatum* y *A. scrobiculata* era superior al área foliar de las plantas testigo y que la inoculación con la especie *G. manihotis* no tuvo efecto sobre el área foliar de plantas de aguacatero en ninguna de las fases evaluadas. Por el contrario Silveira *et al.* (2003) reportaron que las especies *S. heterogama* y *A. scrobiculata* indujeron mayor área foliar por planta, mientras las plantas inoculadas con *G. manihotis* no se diferenciaron de las plantas Control, y las demás especies indujeron área foliar intermediaria entre las dos especies.

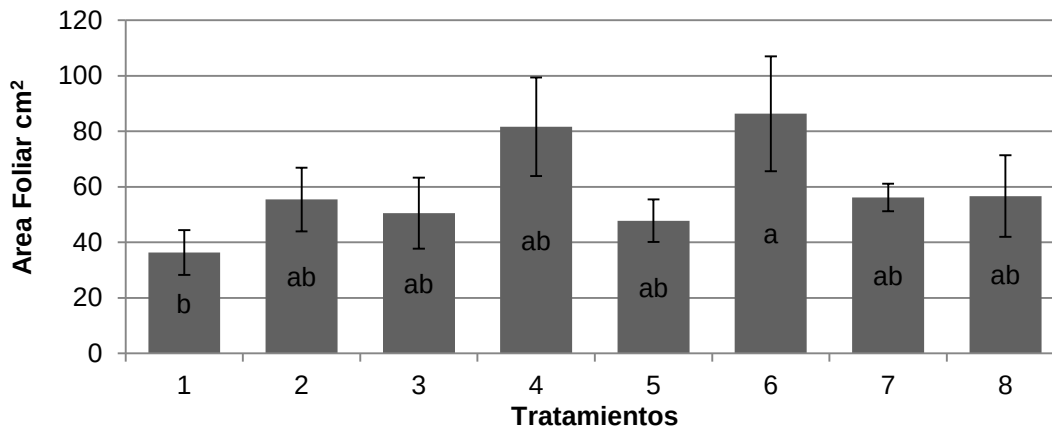


Figura 16. Área foliar (cm²). Promedios de los tratamientos inoculados con HMA trece meses después de la inoculación. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

4.2.7 Área radicular

Para esta variable evaluada trece meses después de la inoculación, si se encontraron diferencias estadísticas significativas, destacando con mayor promedio de área radicular el consorcio de las tres especies T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* seguido por T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* y T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* (Figura 7 y 18), el tratamiento T1 = *Gigaspora margarita* presentó menor área radicular que el testigo. El mayor o menor grado de desarrollo de la raíz condiciona la tasa de absorción de agua por la planta, lo cual a su vez afecta importantes procesos fisiológicos como la fotosíntesis, respiración, elongación celular y muchas otras actividades metabólicas (Slatyer, 1967; Kramer, 1983).

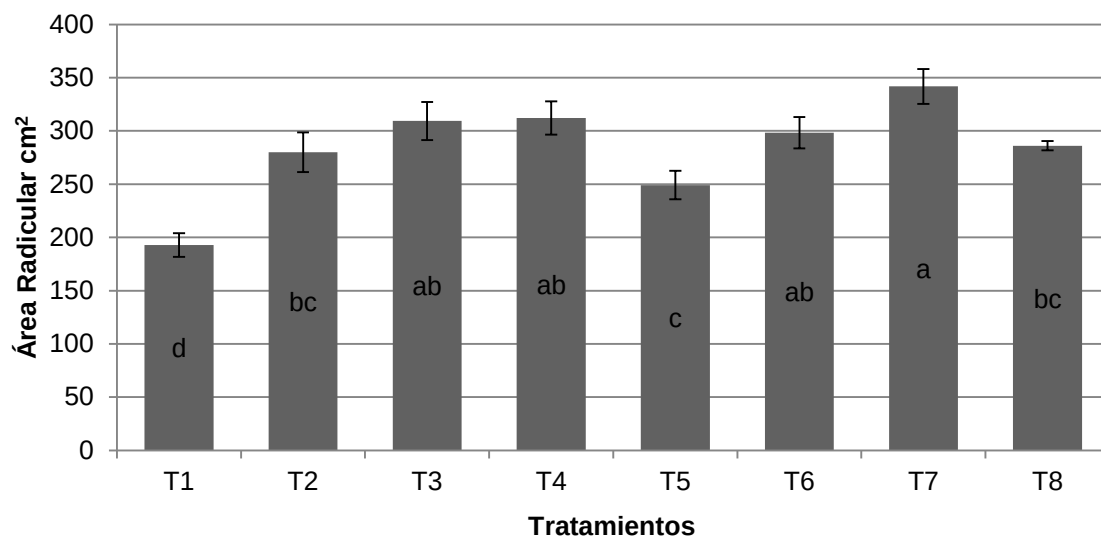


Figura 17. Área radicular (cm²). Promedios de los tratamientos inoculados con HMA después de trece meses. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).



Figura 18. Imagen de raíces. Raíces de los tratamientos de plantas de aguacate, inoculados con HMA, evaluados trece meses después de la inoculación. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

4.2.8 Biomasa aérea y de la raíz

El peso fresco de la parte aérea de las plantas evaluadas trece meses después de la inoculación con HMA mostró que existió diferencia estadística significativa entre algunos tatamientos (Figura 18). Donde el T3 (*Acaulospora scrobiculata*) y el T7 (*Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*) destacaron sobre el tratamiento T1 (*Gigaspora margarita*) 1.5 y 1.0 veces, respectivamente, pese a que el resto de los tratamientos mostraron ser estadísticamente iguales, incluido el testigo (T8).

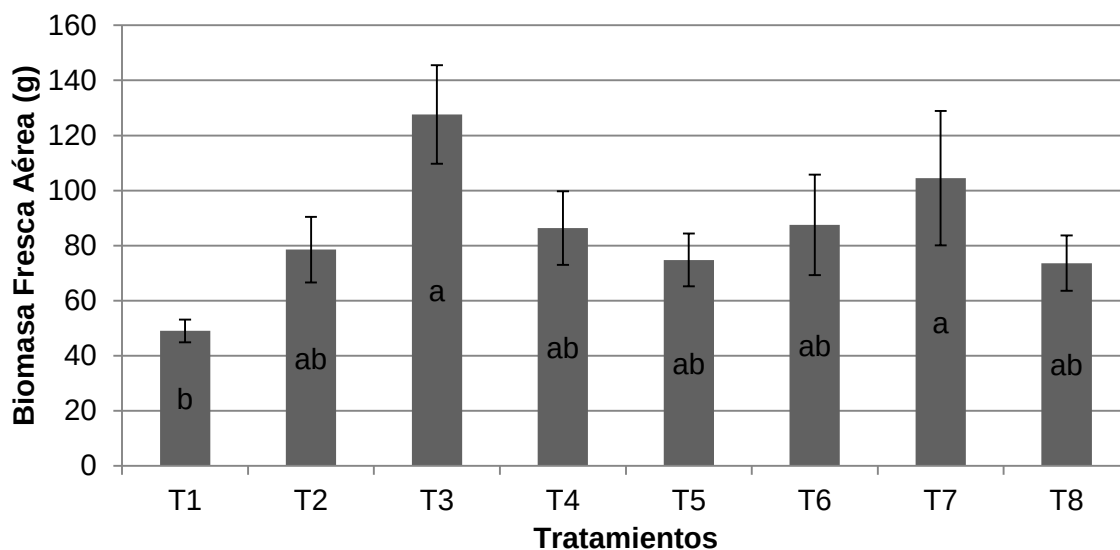


Figura 8. Biomasa fresca aérea. Promedio de biomasa fresca aérea de los tratamientos inoculados con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Respecto al peso seco de la parte aérea evaluada trece meses después de la inoculación sólo mostró diferencia estadística entre el T7 (*Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*) y T1 (*Gigaspora margarita*) siendo 1.2

veces mayor el peso seco de la parte aérea en el T3 (Figura 9), pero los demás tratamientos no mostraron diferencias estadísticas incluyendo el testigo. Es importante señalar que Siqueira *et al.* (1994) reportaron que la inoculación de café con *Gigaspora margarita* generó un incremento de 7 veces en materia seca respecto al testigo a 140 día de haber inoculado.

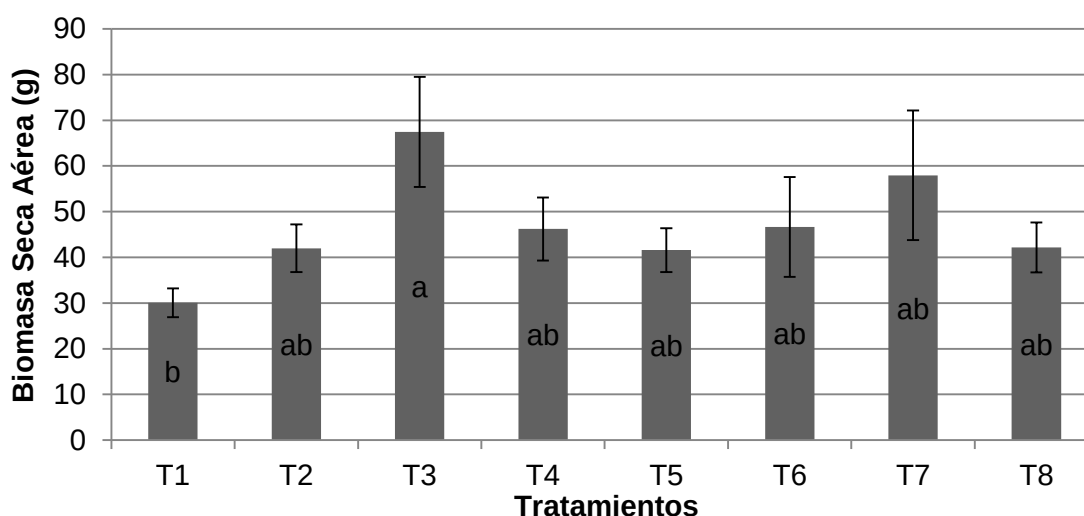


Figura 9. Biomasa seca aérea. Promedios de biomasa seca aérea de los tratamientos inoculados con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

El peso fresco radicular de los tratamientos evaluados trece meses después de la inoculación con HMA se encontró solo diferencia estadística significativa entre el T3 = *Acaulospora scrobiculata* y T1 = *Gigaspora margarita*, los demás tratamientos incluido el testigo fueron estadísticamente iguales (Figura 6). Lo anterior difiere de estudios en invernadero que demuestran que la asociación simbiótica de los hongos micorrízicos en las raíces de las plantas producen diversos cambios y/o modificaciones a nivel fisiológico, entre los que se destacan los incrementos en la actividad fotosintética, por efecto de la mayor capacidad de fijación de CO₂ y, por

consiguiente, el incremento de las tasas de crecimiento y biomasa producida, comparadas con plantas control (Olalde, 1997, Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999).

En relación con la biomasa seca radicular de los tratamientos inoculados con HMA y evaluados trece meses después no se encontraron diferencias estadísticas, Pero Vidal *et al.* (1992) reportó que *G. fasciculatum* además de incrementar la biomasa aérea, también produjo beneficios en el sistema radical, el cual fué mas vigoroso en comparación con plantas no-inoculadas, debido a esto la micorriza se considera como factor clave en la micropropagación de aguacate y otros frutales.

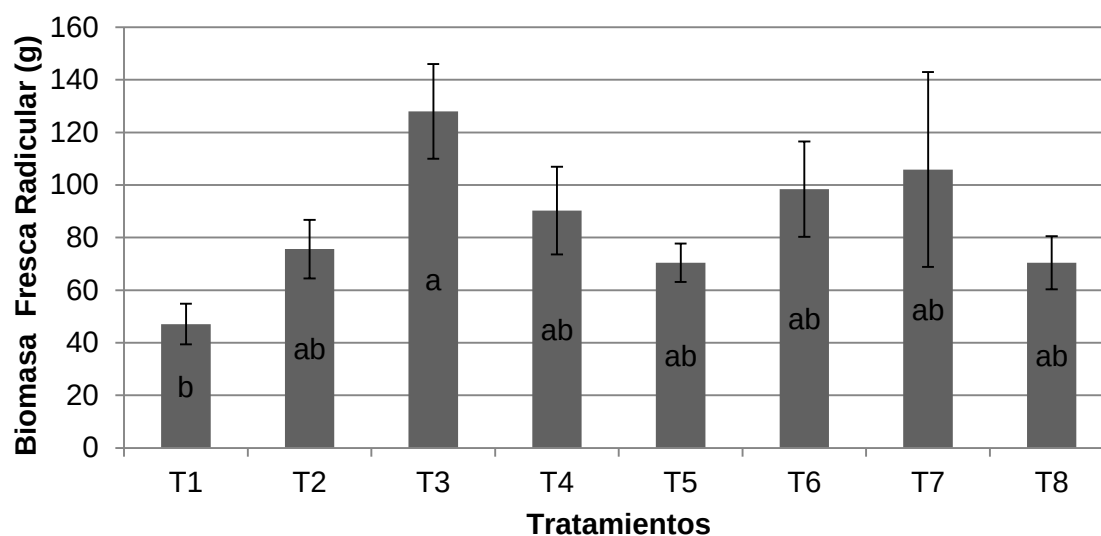


Figura 10. Biomasa Fresca Radicular (g). Promedios de biomasa fresca radicular de los tratamientos evaluados trece meses después de la inoculación con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

4.2.9 Relación MSA/MSR.

La relación materia seca de la parte aérea sobre materia seca de raíz (MSA/MSR) fue mayor a 1 y similar al testigo en todos los tratamientos, a excepción del T6 (*G. mosseae* y *A. scrobiculata*), la cual fue de 2.06 (Figura 22). Otros tratamientos sobresalientes fueron el T1 (*G. margarita*), T4 (*G. margarita* y *G. mosseae*) y T7 (*G. margarita* + *G. mosseae* + *A. scrobiculata*), que corresponden a tratamientos en donde se incluyó *G. margarita*. Estos resultados sugieren que *G. margarita* induce un desarrollo superior de la biomasa de la parte aérea respecto a la biomasa de la raíz. Es importante mencionar que es deseable que la relación MSA/MSR sea cercana a 1.0, ya que esto indicaría un equilibrio funcional entre ambas partes de la planta (Basil *et al.*, 1999), por lo que en este sentido, los tratamientos que presentan un mayor equilibrio funcional son el T2 (*G. mosseae*), T3 (*A. scrobiculata*), T5 (*G. margarita* y *A. scrobiculata*) y el testigo (T8).

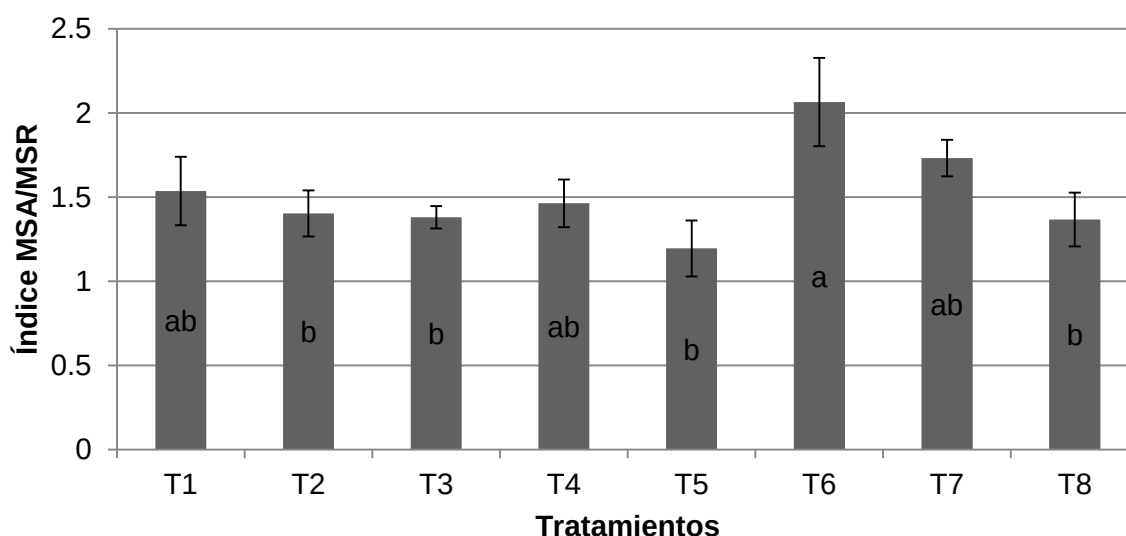


Figura 11. Índice de materia seca aérea (MSA) y materia seca radicular (MSR). Índice promedio de los tratamientos evaluados trece meses después de la inoculación con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

4.3 Efecto de la inoculación de HMA sobre la fisiología de plantas de aguacate.

4.3.1 Concentración de clorofila en hojas de aguacate

La concentración de clorofila en hojas de aguacate se altera diferencialmente de acuerdo a la especie de HMA colonizante.

Esta variable se comenzó a monitorear mensualmente a partir del primer mes después de la inoculación. Se obtuvo una curva para correlacionar Unidades Spad con el contenido de clorofila en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tejido fresco (Anexo I).

El contenido de clorofila se monitoreó mensualmente a partir del primer mes después de la inoculación, los resultados mostraron variación respecto a la respuesta a los distintos tratamientos durante el tiempo de muestreo. Sin embargo se puede observar que en general los tratamientos que fueron inoculados con *A. scrobiculata* y aquellos en donde se incluía *G. mosseae* fueron en los que predominó un contenido de clorofila estadísticamente mayor, mientras que aquellos tratamientos con *G. margarita*, sobre todo donde es la única especie inoculada (T1) es donde se aprecian con mayor constancia los valores más bajos de clorofila, así como en el testigo (Cuadro 5 y Figuras 15 y 16). Estos resultados sugieren un mayor efecto de incremento en el contenido de clorofila en plantas cuando son inoculadas con *A. scrobiculata* o *G. mosseae*, que al ser inoculadas con *G. margarita*. Aunado a esto se puede señalar que este efecto no está directamente relacionado con el porcentaje de colonización radicular, ya que *G. margarita* presentó un porcentaje de colonización similar al de *A. scrobiculata* y aproximadamente 0.6 veces mayor al de *G. mosseae*. El contenido de clorofila está directamente relacionado con la capacidad fotosintética de la planta (Taiz y Zeiger, 2002; Schaffer y Whiley, 2003), por lo que las condiciones en las que se promueve el incremento de la concentración de clorofila, es decir en plantas colonizadas por *A. scrobiculata* o *G. mosseae*, se induce la capacidad fotosintética.

Cuadro 4. Contenido de clorofila. Promedios de observaciones mensuales del contenido de clorofila en $\mu\text{g g}^{-1}$ tejido fresco de plantas inoculadas con HMA aislados de la rizósfera de aguacate. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Tratamientos	Meses después de la Inoculación con HMA					
	1	2	3	5	6	7
T1	1476.62 a	1922.13 ab	1685.74 b	1837.94 a	1194.41 cd	1299.93 bc
T2	1507.87 a	1909.34 ab	1737.94 ab	1988.38 a	1201.03 cd	1578.60 ab
T3	1689.12 a	1927.28 ab	1871.10 ab	1984.12 a	1598.24 a	1453.97 abc
T4	1696.99 a	1959.63 ab	1738.01 ab	2084.71 a	1549.56 ab	1299.71 bc
T5	1696.62 a	2047.94 a	1848.24 ab	2016.84 a	1456.03 abc	1389.41 abc
T6	1614.85 a	1456.76 c	2050.44 a	1895.29 a	1010.74 d	1709.85 a
T7	1672.13 a	1634.85 bc	1856.69 ab	2015.22 a	1591.84 a	1440.96 abc
T8	1540.59 a	1636.91 bc	1673.46 b	2010.96 a	1247.35 bcd	1236.18 c
Tratamientos	Meses después de la Inoculación con HMA					
	8	9	10	11	12	13
T1	1384.26 a	1344.93 a	1298.97 b	1364.93 ab	892.21 d	1181.91 abc
T2	1613.01 a	1497.94 a	1866.47 a	1643.16 ab	1408.16 abc	1276.03 abc
T3	1425.44 a	1129.49 a	1466.10 ab	1431.91 ab	1629.93 a	1137.79 bc
T4	1384.49 a	1480.07 a	1698.97 ab	1755.44 a	1065.00 bcd	1226.03 abc
T5	1466.47 a	1278.24 a	1273.46 b	1557.13 ab	1518.46 ab	1609.85 ab
T6	1475.81 a	1558.60 a	1574.71 ab	1652.87 ab	1371.40 abc	1267.21 abc
T7	1734.63 a	1451.25 a	1401.62 ab	1573.82 ab	1513.53 abc	1714.26 a
T8	1423.31 a	1193.68 a	1337.28 b	1219.04 b	1051.54 cd	1037.79 c

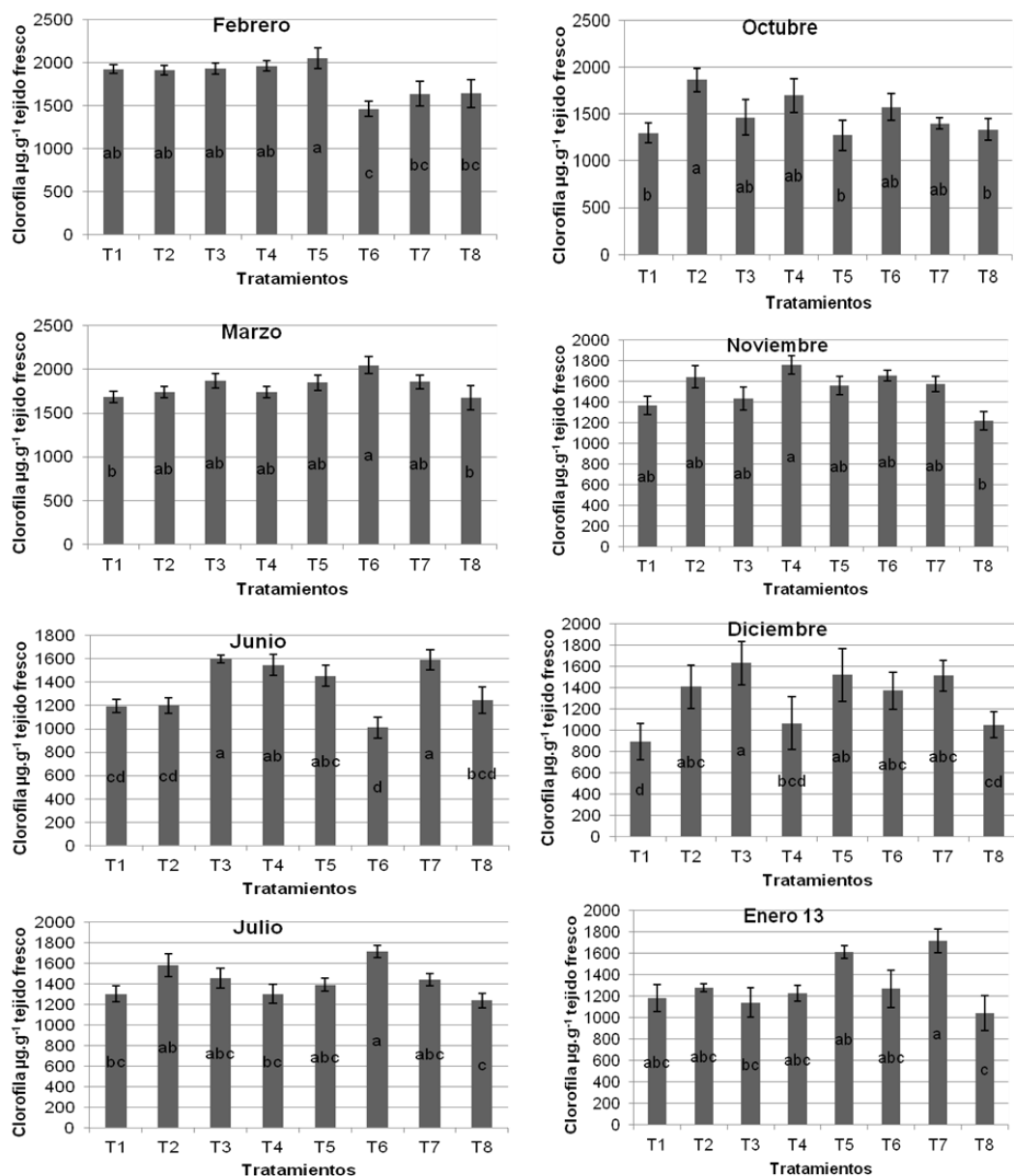


Figura 12. Promedio del contenido de clorofila. Promedio en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tejido fresco, de tratamientos inoculados con HMA aislados de la rizósfera del aguacate. Barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).



Figura 13. Efecto de HMA en el desarrollo foliar de aguacate. Fotografía para ilustrar el contenido de Clorofila de los ocho tratamientos inoculados con HMA evaluados trece meses después de la inoculación. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

4.3.2 Contenido de sólidos solubles en tejido foliar.

Los sólidos solubles en extractos de hoja de cada tratamiento fueron evaluados 13 meses después de la inoculación con HMA. Los resultados mostraron que los tratamientos T2 (*G. mosseae*), T4 (*G. margarita* y *G. mosseae*) y T8 (testigo) presentaron la mayor concentración de sólidos solubles en los extractos foliares (

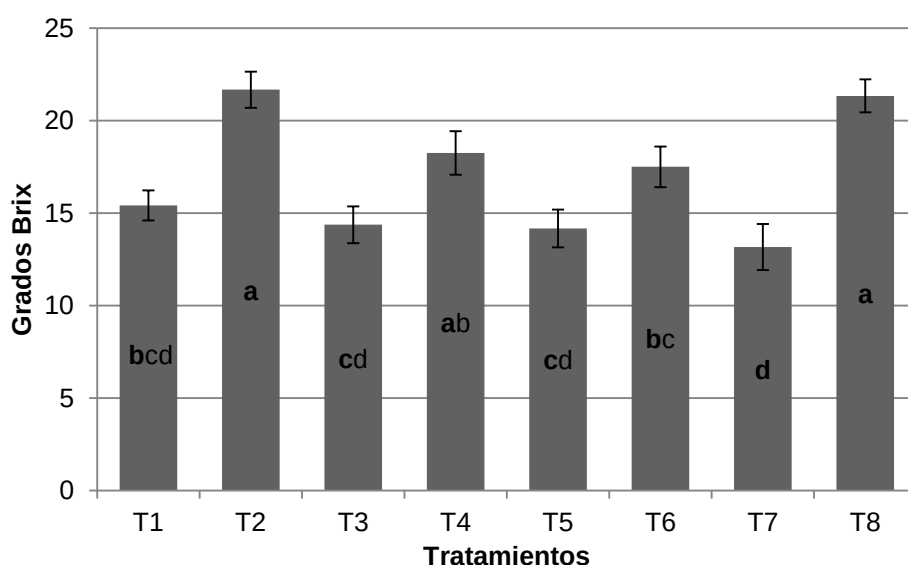


Figura 14). Mientras que el tratamiento con el consorcio de las tres especies de HMA (T7), presentó 0.6 veces menor concentración de sólidos solubles que el testigo, estos resultados podrían indicar que en presencia de tres especies, la demanda por un suministro de fotoasimilados hacia el hongo es mayor y en consecuencia existe una menor acumulación de sólidos solubles en tejido foliar. Por otro lado, en los tratamientos donde se inoculó *G. mosseae* el contenido de sólidos solubles es mayor que en los que incluían *A. scrobiculata*, lo cual podría indicar que las especies *A. scrobiculata* y *G. margarita*, en particular, demandan mayor cantidad de azúcares u otros sólidos solubles. Al respecto Alarcón *et al.* (2003) reportaron que los HMA modifican la concentración de azúcares solubles totales en hojas y raíz de *Citrus volkameriana*, la concentración de azúcares en raíces de plantas inoculadas fue mayor en comparación con plantas testigo. Este efecto denota que los HMA participan como demandantes de fuentes carbonadas para satisfacer sus requerimientos energéticos y, con ello, propiciar beneficios en el crecimiento y tasa de fijación de CO₂ de las plantas.

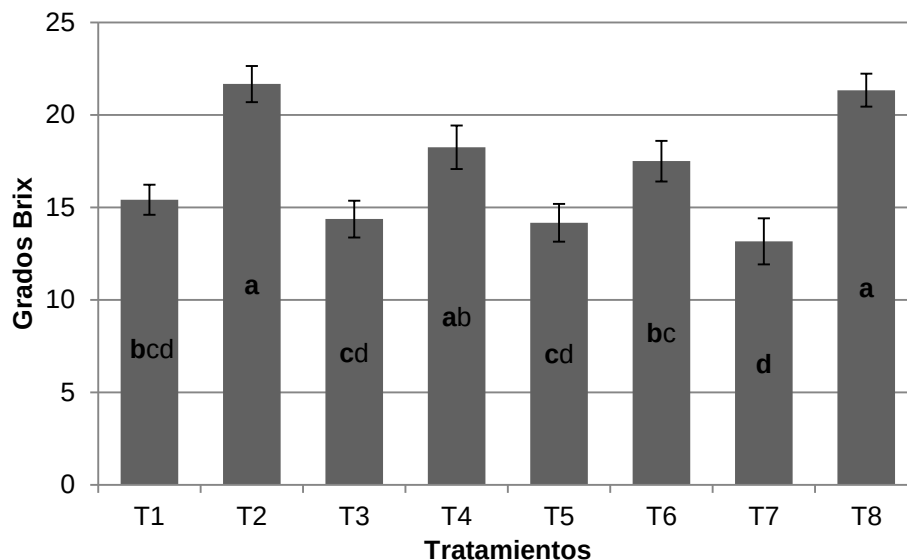


Figura 14. Sólidos solubles totales en hoja de aguacate 13 meses después de inocular con HMA. Promedio de sólidos solubles de hojas de aguacate inoculados con HMA expresados en ° Brix. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

4.3.3 Contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores y almidón.

En arboles como el aguacate, el patrón de acumulación de reservas en los órganos de almacenamiento es determinado por el uso y movilización de carbohidratos durante el desarrollo de la especie (Delgado *et al.*, 2003; Bertling y Bower, 2006), incluso las hojas pueden almacenar grandes cantidades de carbohidratos y minerales que se reciclan durante los períodos de demanda (Whiley, 1990a). Trece meses después de haber sido inoculadas con HMA se determinaron los contenidos de carbohidratos totales, azúcares reductores y almidón en las plantas, y los resultados se describen a continuación:

Carbohidratos totales

El contenido de carbohidratos totales en tejido fresco de las plantas inoculadas con *G. mosseae* (T2) fue 1.4 veces mayor al de plantas sin inocular (T8), con concentraciones de 549.92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y 232.14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tejido fresco, respectivamente (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Los tratamientos con T3, T5, T6 y T7 también presentaron mayor contenido de carbohidratos totales que el testigo, mientras que los tratamientos con *G. margarita* (T1) y *G. margarita* con *G. mosseae* (T4), fueron estadísticamente similares al Testigo (T8). Estos resultados sugieren que el efecto de los HMA en el flujo del carbono en plantas está relacionado con la especie o combinaciones de especies involucradas en la asociación micorrícica. Silveira *et al.*, (2003) observaron resultados similares al inocular aguacate con distintas especies de HMA, en este estudio el contenido de carbohidratos totales en la parte aérea de la planta incrementó con la inoculación de HMA respecto al testigo. En las plantas inoculadas con *S. heterogama*, *G. etunicatum* y *G. clarum*, los incrementos correspondieron a un 52%, 47% y 36%, respectivamente. Mientras que las especies *A. scrobiculata*, *G. margarita* y *G. manihotis* promovieron un incremento de 22.5% respecto a las plantas control.

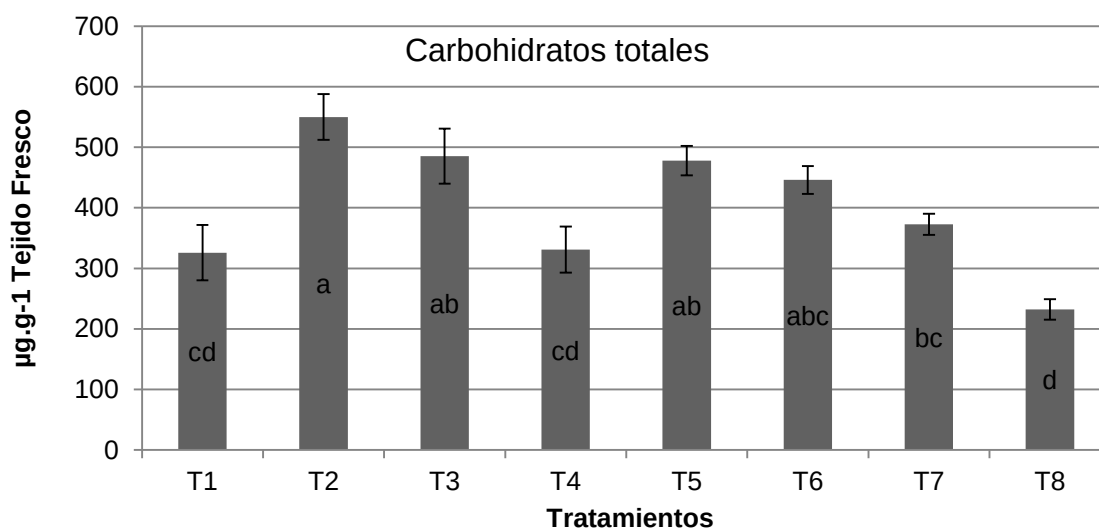


Figura 15. Contenido de Carbohidratos totales. Promedio del contenido de carbohidratos totales en plantas evaluadas trece meses después de la inoculación con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora*

scrobiculata, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Azúcares reductores

Los azúcares reductores contenidos en hoja fueron 2.2 veces más elevados en las hojas de plantas inoculadas con *G. mosseae* (T2) que en el testigo (T8), los otros dos tratamientos en que se inoculó con una especie de HMA, T1 (*G. margarita*) y T3 (*A. scrobiculata*), fueron 2 veces mas altos que el testigo y el resto de los tratamientos, en los que se inocularon distintos consorcios de estas especies, no mostraron diferencia estadística significativa respecto al mismo (Figura 16). Estos resultados confirman que la presencia de HMA promueve el aumento en la producción de azúcares reductores en hojas, como se observa en los tratamientos T1, T2 y T3. Reportes similares fueron señalados por Alarcón *et al.* (2003) al estudiar la interacción de HMA con plántulas de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq., sin embargo, estos resultados comparados con los carbohidratos totales registrados para los mismos tejidos (Figura 16), sugieren que deben estarse acumulando azúcares no reductores en los tratamientos con consorcios de HMA, así como en el tratamiento con *A. scrobiculata*, ya que la concentración de carbohidratos totales respecto a azúcares no reductores en estos tratamientos no corresponden a lo observado en los tratamientos T1 y T2.

la presencia de distintas especies de HMA genera una demanda de carbohidratos más elevada, que podría estar dirigiendo una mayor movilización de los azúcares reductores desde las hojas hacia la raíz, con lo que disminuiría la concentración de

Los tratamientos combinados (T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*) fueron estadísticamente iguales. Sin embargo, Alarcón *et al.* (2003) reportan que en plántulas de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq., los HMA modificaron significativamente el contenido de azucares a 120 días. En diferentes estudios se han reportado azúcares como perseitol y manoheptulosa como los

productos primarios de la fijación fotosintética de CO₂ en aguacate, además de ser componentes característicos del flujo de savia que va desde de las hojas a los vertederos en crecimiento (Cripps y Cowan, 2000; Liu *et al.*, 2002; Xuan *et al.*, 2002; Burdon *et al.*, 2007).

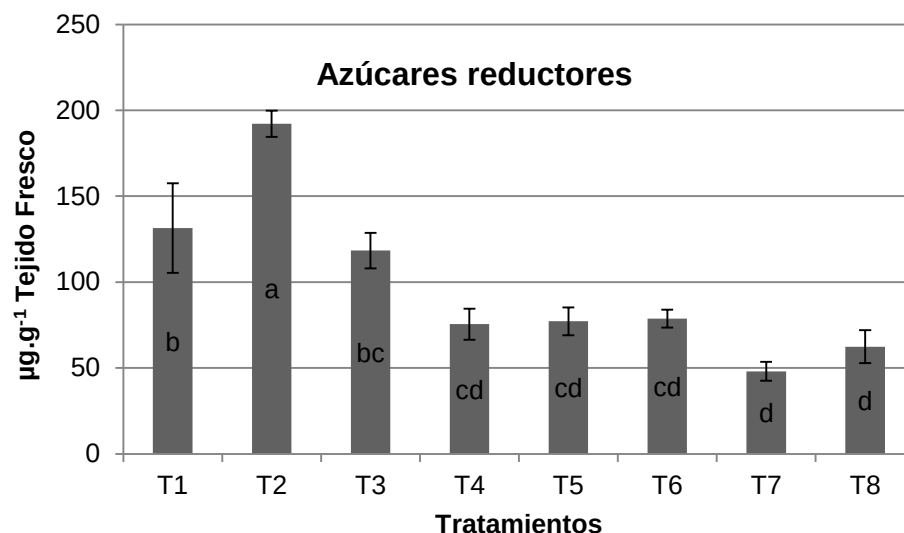


Figura 16. Contenido de Azúcares Reductores. Promedio del contenido en $\mu\text{g.g}^{-1}$ Tejido Fresco, en plantas evaluadas trece meses después de la inoculación con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Almidón

El almidón es la forma más común e importante dentro de los carbohidratos y las concentraciones en las plantas pueden alcanzar el 20% de la masa seca de algunos tejidos; además es el indicador más útil de fluctuaciones estacionales en cosechas y está estrechamente relacionado con el desempeño del árbol (Paz-Vega, 1997). Los componentes estructurales del árbol como tallo y raíces tienen la capacidad de almacenar el exceso de carbohidratos en forma de almidón (Wolstenholme, 1987).

Para contenido de almidón en tejido fresco de las plantas evaluadas trece meses después de la inoculación con HMA se encontró diferencia estadística destaco con mayor contenido el T3 = *Acaulospora scrobiculata* con $12.975 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Figura 17), respecto al T8 = testigo $4.404 \mu\text{g.g}^{-1}$ sin embargo, los tratamientos, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* son similares con el T8 = testigo.

De acuerdo con Taiz y Zeiger (2002) el almidón y los azúcares solubles son los principales carbohidratos de reserva disponibles para proveer energía de crecimiento y mantenimiento. Esto coincide ya que el T3 = *Acaulospora scrobiculata* también presenta mayor biomasa fresca y biomasa seca aérea así como mayor incremento del crecimiento. Por otra parte, se sabe que en árboles como el aguacate, el patrón de acumulación de reservas en los órganos de almacenamiento es determinado por el uso y movilización de carbohidratos durante el desarrollo de la especie (Delgado *et al.*, 2003; Bertling y Bower, 2006).

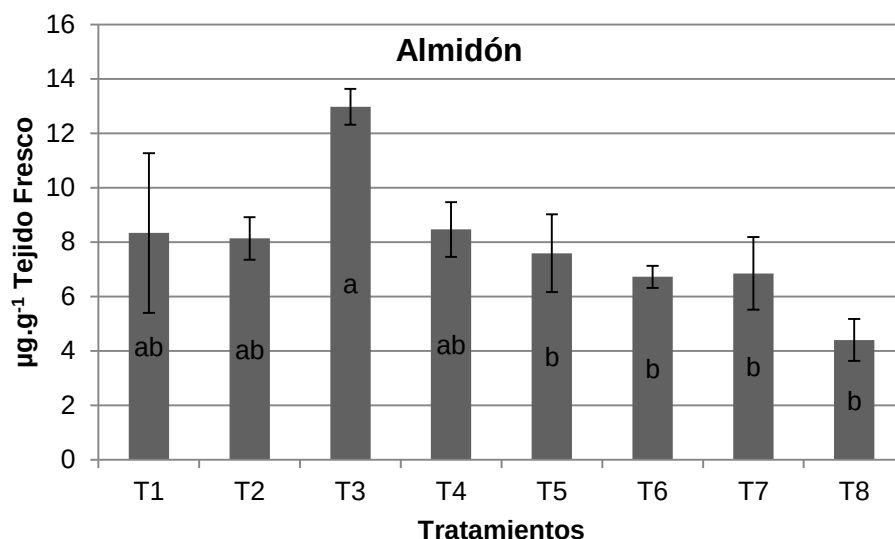


Figura 17. Contenido de almidón. Promedio del contenido de almidón de los tratamientos inoculados con HMA después de trece meses de la inoculación. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

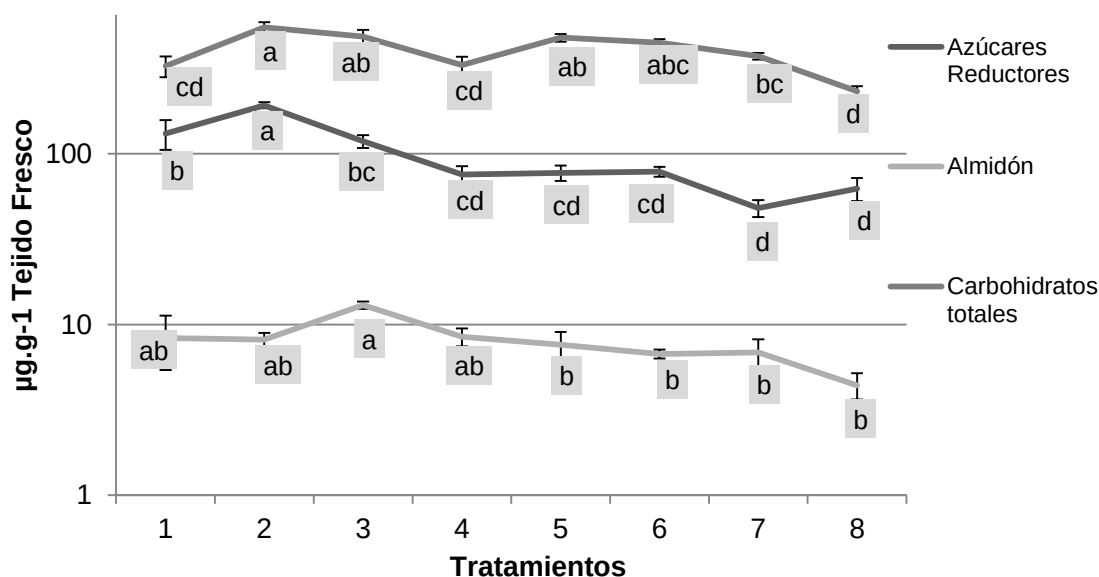


Figura 18. Comparación azúcares. Comparación del contenido en µg.g⁻¹ de Almidón, Azúcares reductores y Carbohidratos totales en plantas evaluadas a trece meses después de inoculadas con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

4.3.4 Nutrientes en tejido foliar

La concentración de nutrientes se analizó por hoja (a) y área foliar (b) de las plantas evaluadas trece meses después de la inoculación.

a) Concentración por hoja

Con relación a la concentración por hoja (Figura 19), se observó diferencias estadísticas para Fe (Figura 20). Para la concentración de Fe, fue mayor en los tratamientos T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* (Figura 20) y menor en el T1 = *Gigaspora margarita*.

Lo anterior difiere con Smith y Read, (1997), quienes aseveran que los HMA colonizan las raíces de las plantas formando una extensa red de micelio en el suelo que les proporciona beneficios como: mayor transporte de agua y nutrimentos, especialmente P, Cu y Zn.

Sin embargo, Silveira *et al.* (2003) encontraron diferencias en los niveles de nitrógeno foliar para plantas inoculadas con *Glomus* y con *Acaulospora* con respecto al tratamiento control.

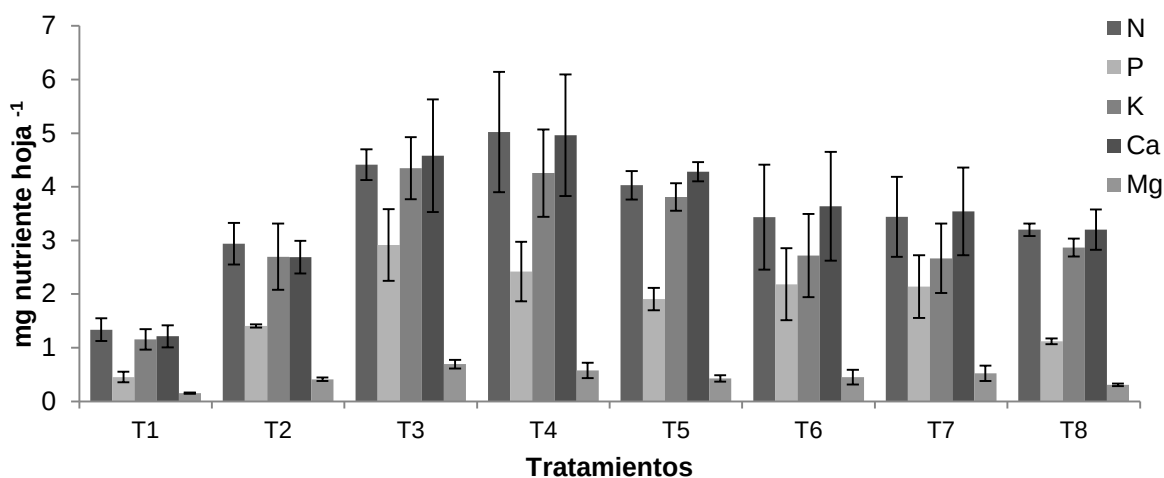


Figura 19. Concentración de nutrientes en hoja. Promedios en mg de nutriente por hoja de N, P, K, Ca y Mg de los tratamientos evaluados trece meses después de la inoculación con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora*

scrobiculata, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Para los demás elementos N, P, K, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, y B la concentración por hoja, no mostró diferencias estadísticas (Figura 21 y Cuadro 5)

Si se cuenta que el análisis del sustrato utilizado indicó un bajo contenido de fósforo y solo se aplicó una fertilización mínima, Smith *et al.* (1981) observaron concentraciones elevadas de potasio en la parte aérea de plantas micorrizadas de *Trifolium subterraneum* en suelos deficientes de fósforo. También, se debe tener en cuenta que los microelementos no fueron analizados en el sustrato utilizado.

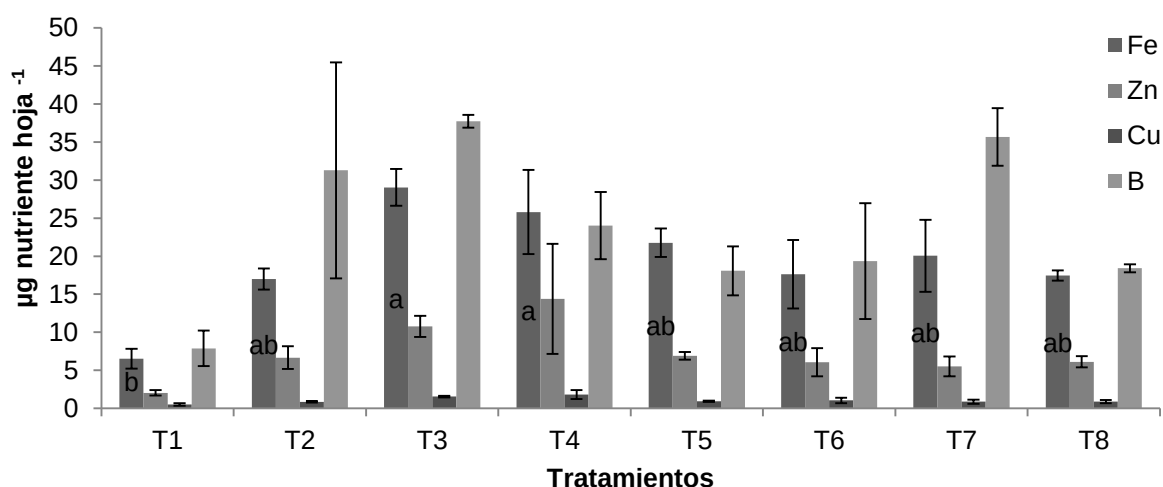


Figura 20. Concentración de nutrientes en hoja. Promedios en µg de nutriente por hoja de Fe, Zn, Cu, y B de los tratamientos evaluados trece meses después de la inoculación con HMA. Tratamientos: T1 = *Gigaspora margarita*, T2 = *Glomus mosseae*, T3 = *Acaulospora scrobiculata*, T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae*, T5 = *Gigaspora margarita* + *Acaulospora scrobiculata*, T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*, T7 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata* y T8 = sin HMA (Testigo).

Cuadro 5. Concentración de nutrientes por hoja. Promedio de la concentración de nutrientes en los tratamientos evaluados trece meses después de la inoculación con HMA.

Trat	mg Hoja ⁻¹					
	N	P	K	Ca	Mg	
T1	1.34 a	0.45 a	1.15 a	1.21 a	0.15 a	
T2	2.94 a	1.41 a	2.70 a	2.69 a	0.41 a	
T3	4.41 a	2.92 a	4.35 a	4.58 a	0.69 a	
T4	5.02 a	2.42 a	4.26 a	4.96 a	0.58 a	
T5	4.03 a	1.91 a	3.81 a	4.28 a	0.43 a	
T6	3.43 a	2.18 a	2.72 a	3.64 a	0.45 a	
T7	3.44 a	2.14 a	2.67 a	3.54 a	0.52 a	
T8	3.20 a	1.12 a	2.87 a	3.20 a	0.31 a	
Trat	µg Hoja ⁻¹					
	Fe	Mn	Zn	Cu	B	
T1	6.53 b	119.91 a	2.04 a	0.51 a	7.89 a	
T2	17.00 ab	265.40 a	6.67 a	0.86 a	31.28 a	
T3	29.05 a	316.90 a	10.77 a	1.55 a	37.74 a	
T4	25.80 a	335.10 a	14.39 a	1.82 a	24.03 a	
T5	21.76 ab	335.00 a	6.89 a	0.92 a	18.07 a	
T6	17.61 ab	220.90 a	6.08 a	1.04 a	19.37 a	
T7	20.05 ab	294.60 a	5.51 a	0.87 a	35.68 a	
T8	17.47 ab	316.20 a	6.12 a	0.89 a	18.41 a	

b) Concentración por área foliar

Para la concentración de nutrientes analizada por área foliar después de trece meses de la inoculación con HMA, indicó diferencias estadísticas para P, K, Mg y Fe. Para P el T4 = *Gigaspora margarita* + *Glomus mosseae* mostraron el mayor promedio (Figura 21 y Cuadro 6). Esto coincide con Silveira *et al.* (2003) que reportaron que las plantas inoculadas con *A. scrobiculata* presentaron contenidos superiores de P, Cu y Zn. De acuerdo com Harrison, (1997) la asociación MA desarrolla múltiples funciones, entre las que destacan: incremento en el suministro de nutrimentos, como P, Ca y Zn.

Con relación a la concentración de K, Mg y Fe fue mayor en el T3 = *Acaulospora scrobiculata* y menor en los tratamientos T1 = *Gigaspora margarita* y T6 = *Glomus mosseae* + *Acaulospora scrobiculata*.

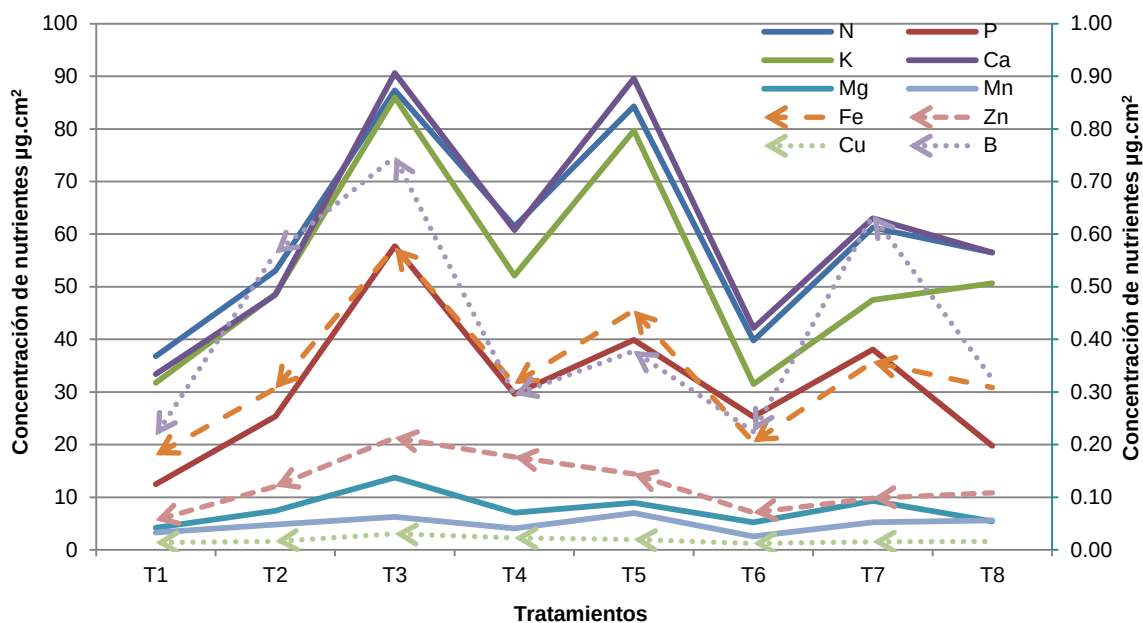


Figura 21. Concentración de nutrientes por área foliar. Promedios en $\mu\text{g.cm}^2$ estimada de acuerdo al área foliar de las plantas inoculadas con HMA evaluadas trece meses después de la inoculación. Los valores de Fe, Cu, Zn y B pertenecen al eje vertical con valores de 0 a 1.

Cuadro 6. Concentración de nutrientes por área foliar. Promedios en $\mu\text{g.cm}^2$ de tejido vegetal, de los tratamientos evaluados trece meses después de la inoculación con HMA.

Trat.	Concentración de nutrientes $\mu\text{g.cm}^2$					
	N	P	K	Ca	Mg	
T1	36.80 a	12.48 b	31.75 b	33.39 a	4.22 b	
T2	53.01 a	25.36 ab	48.62 ab	48.50 a	7.39 ab	
T3	87.33 a	57.72 a	86.02 a	90.64 a	13.71 a	
T4	61.45 a	29.62 ab	52.11 ab	60.75 a	7.06 ab	
T5	84.29 a	39.88 ab	79.69 ab	89.58 a	8.92 ab	
T6	39.78 a	25.30 ab	31.51 ab	42.14 a	5.21 b	
T7	61.24 a	38.10 ab	47.48 ab	63.02 a	9.32 ab	
T8	56.48 a	19.77 ab	50.65 b	56.48 a	5.41 ab	
Trat.	Concentración de nutrientes $\mu\text{g.cm}^2$					
	Fe	Mn	Zn	Cu	B	
T1	0.18 b	3.30 a	0.06 a	0.01 a	0.22 a	
T2	0.31 ab	4.79 a	0.12 a	0.02 a	0.56 a	
T3	0.57 a	6.27 a	0.21 a	0.03 a	0.75 a	
T4	0.32 ab	4.10 a	0.18 a	0.02 a	0.29 a	
T5	0.46 ab	7.01 a	0.14 a	0.02 a	0.38 a	
T6	0.20 b	2.56 a	0.07 a	0.01 a	0.22 a	
T7	0.36 ab	5.24 a	0.10 a	0.02 a	0.64 a	
T8	0.31 ab	5.58 a	0.11 a	0.02 a	0.32 a	

Siqueira *et al.* (2002), afirman que estos hongos al aumentar el área de contacto entre las raíces y el suelo favorecen la absorción de nutrientes, preferentemente aquellos que se mueven por difusión, como es el caso del P, Mg, K, Mn y Fe.

Se confirma el hecho de que no todas las especies de HMA son eficientes en el auxilio de la absorción de nutrientes, puesto que Menge *et al.* (1980) observó que *G. fasciculatum* no favoreció un aumento significativo en la absorción de Ca y Mg en plántones de aguacate, con las especies *A. scrobiculata*, *G. margarita* y *G. manihotis*.

V. CONCLUSIONES

Las morfoespecies de HMA popagadas en macetas trampa se identificaron como: *Acaulospora scrobiculata*, *Gigaspora margarita* y *Glomus mosseae*. *A. scrobiculata* presentó mayor número de esporas al propagarse con sorgo en cultivo monoespecífico.

La respuesta a la inoculación con las especies de HMA seleccionadas de huertos de aguacate, para las condiciones estudiadas: se observó seis meses después de la inoculación en un incremento mayor para el tratamiento Inoculado con *A. scrobiculata* (T3), seguido del tratamiento inoculado por el consorcio de las tres especies. Esto sugiere que bajo estas condiciones *A. scrobiculata* y el consorcio aportan beneficios para el incremento en altura y contenido de clorofila a las plantas de aguacate en esta etapa. Nueve meses después de la inoculación se observó beneficios para diámetro con el mismo tratamiento (T3). Tal efecto puede sugerir una mejor relación en términos de eficiencia entre las plantas de aguacate criollo y *A. scrobiculata*.

La inoculación evaluada trece meses después en las plantas indicó una mayor área foliar para el tratamiento inoculado con *G. mosseae* y *A. scrobiculata* (T6), mayor área radicular para el tratamiento inoculado con las tres especies (T7) y un porcentaje mayor de colonización para el tratamiento inoculado con *A. scrobiculata* T3. Para biomasa fresca y seca tanto aérea como radicular el tratamiento con *A. scrobiculata* el contenido fue mayor para el T3.

Para contenido de clorofila el tratamiento de las tres especies (T7) presentó mayor contenido. El contenido de sólidos solubles fue mayor para el T2 y T8, azúcares reductores y carbohidratos totales fueron mas altos para el tratamiento inoculado con *G. mosseae* (T2). El mayor contenido de almidón se presentó con *A. scrobiculata* (T3).

La concentración de N y Fe por hoja fue mayor para en el tratamiento inoculado con *G. margarita* y *G. mosseae* (T4), K, Mg y Fe fueron mas altos en el tratamiento

inoculado con *A. scrobiculata* (T3). La concentración de nutrientes por área de P, K, Mg y Fe fue mayor en el tratamiento inoculado con *A. scrobiculata* (T3).

La morfoespecie *A. scrobiculata* utilizada en el experimento, presentó los valores más altos entre las variables evaluadas, muestra una mejor respuesta que podría traducirse como la compatibilidad entre plántulas de aguacate y HMA, además los resultados de este estudio podrían señalar una complementariedad funcional entre esta morfoespecie y la var. *drymifolia* de aguacate criollo, debido a la respuesta de crecimiento de la planta resultado de tal interacción.

VI. LITERATURA CITADA

- Aboul-Nasr, S. A. (1996). Effects of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza on *Tagetes erecta* and *Zinnia elegans*. *Mycorrhiza* 6:61-64 pp.
- Aguirre, P. S. (2008). Evaluación de la materia orgánica y de microorganismos en suelos de huertos de aguacate *Persea americana* Mill. en Uruapan, Mich.
- Akhtar, M. S. y Siddiqui A. Z. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungie as potential bioprotectants againts plant pathogens. Pp 61-97. In : Siddiqui, Z A., M. S. Akhtar y k. Futai (eds). *Micorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Science y Business Media B. V.
- Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato R. (2001). Biofertilizantes: Importancia y Manejo en la Agricultura. *Rev. Agricultura Técnica de México*. 26:63-75pp.
- Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. (1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana* 17 (3): 179-191.
- Almaraz, T. M. C. y Reyes R. L. (2007). Diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares en huertos de aguacate de Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" UMSNH, Uruapan, Mich. 87 Pp.
- AOAC. (2000). Official methods of analisys of the Association of Oficial Agricultural Chemist. 17ª edición. USDA.
- Árciga García F. (2008) Selección de plantas hospederas adecuadas para producción de inóculo de Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares por el método de cultivo en macetas. UMSNH.
- Azcón-Aguilar, C., A. Barceló, M. T. Vidal, and G. de la Viña. 1992. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropopagated avocado plants. *Agronomie*. 12: 837-840.
- Azcón-Aguilar, C., Pozo, M. N., Ferrol, N., y Barea, J. M. (2004). Papel de las micorrizas Arbusculares en la protección de la planta frente a patógenos del suelo: posibles mecanismos implicados. En: Frías HJT, Olalde PV y Ferrera SR (eds). *Avance en el conocimiento de las micorrizas*. Universidad de Guanajuato, México. 50-65 Pp.

- Baath, E., Anderson, T. H. (2003). Comparision of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA based techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 955-963.
- Bago, B., Shachar-Hill, Y., and Pfeffer, P.E., (2001) Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytol.* 149: 4–8.
- Bárcenas, O. A. E. (2008) Efecto de mejoradores de suelo sobre la diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares en huertos de aguacate. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nayarit. 63 Pp.
- Bárcenas, O. A. E., Varela, F. L., Carreón, A. Y., Lara, Ch. M. B. N., González, C. J. C. y Aguirre, P. S. (2006) Estudios sobre hongos micorrizógenos arbusculares en huertos de aguacate *Persea americana* Mill. (RANALES: LAURACEAS). En Memoria de XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. SMCB. Manzanillo, Col. 1-5 Pp.
- Bárcenas, O. A. E., Varela, L., Castro, E., Feliciano, R., Chávez -Bárcenas, T. (2010) Propagación de hongos micorrizógenos arbusculares de huertos de aguacate: En memoria del VI Symposium nacional y tercera reunión iberoamericana de la simbiosis micorrízica.
- Bárcenas-Ortega A, Varela-Fregoso, L., Stürmer, S. L., Chávez-Bárcenas A.T. Catálogo de hongos micorrizógenos arbusculares de huertos de aguacate de Michoacán, Méx. En <http://www.worldavocadocongress2011.com/userfiles/file/Ana%20Barcenas-Ortega%201130-1150.pdf>
- Bárcenas-Ortega, A. E., Varela-Fregoso, L., Stürmer, S. L., Aguirre-Paleo, S., Chávez-Bárcenas, A. T. (2009) Identificación de hongos micorrizógenos en cultivo de aguacate. En Memoria de la International Conference on Mycorrhiza, Belo Horizonte, Brasil.
- Barrera B., S. E. (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. Facultad de ciencias agropecuarias. Vol 7. No 1.
- Barrera, B, S. E. (2009) El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Rev. Bio. Agro.* 2009, Vol.7, N.1, pp. 123-132. ISSN 1692-3561. [online].
- Basil G., Mazzarino M.J., Roselli L. y Letourne F. 2009. Efecto del compost de biosólidos en la producción de plantines de *Austrocedrus chilensis* (ciprés de la cordillera). *ci. suelo (argentina)* 27(1): 49-55.

- Becker, W. N., (1976) Quantification of onion vesicular-arbuscular mycorrhizae and their resistance to *Pyrenochaeta terrestris*. Ph.D. dissertataion, University of Illinois, Urbana, IL.
- Benedetto, A., Magurno, F., Bonfante, P., and Lanfranco, L. (2005) Expression profiles of a phosphate transporter gene (GmosPT) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 620–627.
- Bertling y Bower, 2006) Bertling, I. y J. Bower. 2006. Avocado sugars during early fruit development. South African Avocado Growers Association Yearbook. 29, 38-39.
- Bertling y Bower, 2006) Bertling y Bower, 2006; Bertling, I. y J. Bower. 2006. Avocado sugars during early fruit development. South African Avocado Growers Association Yearbook. 29, 38-39.
- Blanco, F. A. y Salas A. E. (1997) Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 21: 55-67.
- Blaszkowski, J. (1993). Comparative studies on the occurrence of arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) in cultivated and uncultivated soils of Poland. *Acta Mycol.* 28: p. 93-140.
- Bonfante, P. y Genre, A. (2010) Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* (1):48.
- Bonfante, P. y Requena, N. (2011) Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 451-457.
- Brundett, M. (2004). Diversity and Classification of Mycorrhizal Associations *Biol Rev.* 79:473-495.
- Brundrett, M., Bougher, N., Grove, T. y Malajczuk, N. (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Monograph, Canberra, Australia. 375p.
- Bucher, M., (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* 173: 11–26.
- Burdon et al., 2007). Burdon, J., N. Lallu, G. Haynes, P. Pidakala, P. Willcocks, D. Billing, K. McDermott, D. Voyle y H. Boldingh. 2007. Carbohydrate status of late season 'Hass' avocado fruit. New Zealand Avocado Growers Association. Annual Research Report. 7, 97-102.

- Burgis, D. S., H. S. Wolfe. 1946. Do avocado roots develop root-hairs? California Avocado Society. Yearbook. p.77-78. Esta se elimino en el escritopero debe revisarse.
- Calabrese, F. (1992) El Aguacate. Ediciones Mundi Prensa. P 249.
- Calderón, S. F. y Pavlova M. (2001) Metodologías de Análisis, en Métodos análisis en Plantas. http://www.drcalderonlabs.com/Metodos/Analisis_Foliar/Metodos_Analisis_Foliares.htm (04 agosto 2011)
- Carbon production and fruit set. pp 52-55. En: Proceedings of Avocado Brainstorming. Riverside, California.
- Castillo, C., (2005). Biodiversidad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas agro-forestales del centro sur de Chile. Universidad de la Frontera Temuco, Chile.
- Cordier, C., Pozo, M. J., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V., 1998, Cell defence responses associated with localised and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Plant Microbe Interc.* 11: 1017–1028.
- Covacevich, F. y Echeverria, H. E. (2010) Indicadores para seleccionar inóculos de hongos micorrízicos arbusculares eficientes en suelos moderadamente ácidos. *Cienc. suelo [en línea]*. 2010. 28: (1), pp. 9-22. ISSN 1850-2067.
- Cripps, R. y A. Cowan. 2000. Sucrose movement and metabolism in small Hass avocado fruit. *South African Avocado Growers Association Yearbook*. 23, 63-69.
- Cruz, C., Egsgaard, H., Trujillo, C., Ambus, P., Requena, N., Martins-Loucao, M.A., and Jakobsen, I., (2007) Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* 144: 782–792.
- Cuenca, G., Cáceres A., Hasmy Z. y Urdaneta C. (2007) Las micorrizas Arbusculares como alternativa para la agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*. 32: 23-29.
- Da Silva, J. y Cardoso, E. (2007). Micorriza arbuscular en cupuaçu e pupunha cultivados en sistema agroforestal y en monocultivo en Amazônia Central. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41(5): 819-825.
- Delgado, G., A. Castillo, E. Avitia y M. Arriaga. 2003. Contenido de carbohidratos en hojas e inflorescencias de tres cultivares de aguacate (*Persea americana*

- Mill.). En: Avocado Source, <http://www.avocadosource.com>. 7 p.; consulta; octubre de 2011.
- Dever, J. D., Schultz, P. A., Pringle, A. y Morton, J. B. (2001) Arbuscular Mycorrhizal Fungi: More Diverse than Meets the Eye, and the Ecological Tale of Why. *BioScience* 51: 923-931.
- Dickson, S. (2004) The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 163: 187-200.
- Dodd, J. C. y Thompson, B. D. (1994) The screening and selection of inoculants arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 159: 149 - 158
- Ezawa, T. Smith, S. E. y Smith, F. A. (2001) Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra-and-intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 149: 555-563.
- Ezawa, T., Hayatsu, M., y Saito, M., (2005) A new hypothesis on the strategy for acquisition of phosphorus in arbuscular mycorrhiza: up-regulation of secreted acid phosphatase gene in the host plant. *Mol. Plant Microbe Inter.* 18: 1046–1053.
- Ezawa, T., Saito, M. y Yoshida, T. (1995) Comparison of phosphatase localization in the intraradical hypha of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus* spp. And *Gigaspora* spp. *Plant and Soil* 176: 57-63.
- FAO, (2011) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura En: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>
- Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A. (2004) Biotecnología de los hongos micorrízicos Arbusculares en: La biofertilización como tecnología sostenible.
- Ferrol, N., Pozo, M. J., Antelo, M., y Azcón-Aguilar, C. (2002) Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. *J.Exp. Bot.* 53: 1683–1687.
- García, G. J. M. y Ocampo J. A. (2002) Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 53: 1377-1386.
- García-Chapa, M., Batlle, A., Lavina, A., Camprubi, A., Estaun, V., y Calvet, C., (2004) Tolerance increase to pear decline phytoplasma in mycorrhizal OHF-

- 333 pear root stock. XIX Int. Symp. on Virus and Virus Like Diseases of Temperate Fruit Crops-Fruit Tree Diseases, ed., Llacer, G., Valencia, Spain.
- Gerdeman, J. W. y Nicolson, T. H. (1963) Spores of Mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wetsieving and decanting. Trans. Brit. Mycol. Soc. 46: 235-244.
- Gianinazi-Pearson, V. y Gianinazi, S. (1998) The physiology of vesicular arbuscular mycorrhizal roots. Plant and Soil 71: 197-209 Pp.
- Gianinazzi, S. y Vosatka, M. (2004) Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems, science meets business. Can. J. Bot., 82, 1264–1271.
- Gómez-Cruz, G. (1995) La micorriza vesículo arbuscular en frutales. In: R. Ferrera-Cerrato, R y J. Pérez-Moreno (eds.) Agro microbiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas., Montecillo, Estado de México. Pp 184-199.
- González, J 2005, Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en un agroecosistema de aguacate (*Persea americana* Mill) comparado con un bosque natural, Tesis de Maestría. Morelia, Michoacán, México.
- González-Chávez M. (2005) Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. TERRA Latinoamericana, 23(1): 29-37
- González-Chávez, M.C., Ferrera-Cerrato R. y Pérez-Moreno J. (1998) Biotecnología de la micorriza arbuscular en frutales. Universidad Autónoma de Tlaxcala y Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México. 127: 93-99.
- Govindarajulu, M. Philip E. P., Hairu J., Abubaker J., Douds D. D., Allen J. W., H. Bücking H., Lammers P. J. y Shacharill Y. (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis NATURE. 435(9) June 2005-820.
- Grant et al., 2011). Grant, T., A. Barnett, H. Boldingh, T. Elmsly y P. Minchin. 2011. Is boron transport to avocado flowers regulated by carbohydrate supply? p 6. En: Memorias VII World Avocado Congress. Cairns, Australia.
- Guerra, S. B. E. (2008) Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. Tecnología en Marcha. 21-(1),Ene-Mar 191-201
- Guerrero, E. (1996) Micorriza: fundamentos biológicos y estado del arte. En: Guerrero E, Azcón C, Barea J M, Moyersoen B, Orozco C, Cano C, Mejía D, Mayer J, Rivillas C y Rivera de B E L (editores) Micorrizas: recurso biológico del suelo. Bogotá, Fondo FEN, Colombia. p 1-46.

- Hadari, M. 2004. A three-dimensional model of the light regime in an avocado orchard. Tesis de Maestría. Israel Institute of Technology. Israel.
- Hamel, C. (1996) Manejo básico de la micorriza arbuscular MA con énfasis en suelos degradados. Medellín, Instituto de Ciencias Naturales y Ecología (ICNE), Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 180p.
- Harrison, J. M. (1997) The arbuscular mycorrhizal symbiosis: An underground association. Review Elsevier Trends Journal 29(2):54-60.
- Hass J. H. y Mengue J. A. (1990) VA-mycorrhizal fungi and soil characteristics in avocado (*Persea americana* Mill) orchard soils. Plant and Soil 127: 207-212.
- Hernández, A. C. A. (2001) Efecto del hongo micorriza (*Glomus intraradices* Schenk y Smith) en el crecimiento del portainjerto mexícola (*Persea americana* Mill) cultivado bajo cinco tratamientos de fertilización. Universidad Católica de Valparaíso; Facultad de Agronomía. Área Fruticultura Quillota, Chile.
- Hernández, L., Escalona, M. A. (2003) Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. La Ciencia y el Hombre 16: 19-25.
- INVAM, (International Culture collection of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. (2010) (En línea) <http://invam.caf.wvu.edu/>.
- Jaizme-Vega, M. C. y Azcón, R. (1995) Responses of some tropical and subtropical cultures to endomycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 5: 213-217
- Jeffries, P. y Barea, J. M. (2001) Arbuscular mycorrhiza: a key component of sustainable plant–soil ecosystems. In: Hock B, ed. The Mycota: fungal associations, Vol. IX. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 95–113.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., y Barea, J. (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Biol Fertil Soils. 37:1-16.
- Johansson, F., Paul, L., y Finlay, R. (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. FEMS Microbiology Ecology, 48: 1-13.
- Koske, R. E. y Gemma, J. N. (1989) 'A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas', Mycological Research, vol. 92, pp. 486–505.
- Kramer, P. (1983) Water relations of plants. N.Y. Academic Press. Cap. 3 y 9. 1983.

- Linderman, R. G. (1992) Vesicular–arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: Bethlenfalvay GJ, Linderman G, eds. Mycorrhizae in sustainable agriculture. Madison, Wisconsin: ASA Special Publication, 45–70.
- Lingua, G., D’Agostino, G., Massa, N., Antosiano, M., y Berta, G., (2002) Mycorrhiza induced differential response to a yellow disease in tomato. *Mycorrhiza* 12: 191–198.
- Liu, X., R. Hofshi y M. Arpaia. 1999. Hass avocado leaf growth, abscission,
- Liu, X., M. Mickelbart, P. Robinson, R. Hofshi y M. Arpaia. 2002. Photosynthetic Characteristics of Avocado Leaves. *Acta Hort.* 575, 865-875.
- Lovelock, C. E., K. Andersen y Morton, J. B. (2003) Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forests are affected by host tree species and environment. *Oecología* 135: 268-279.
- Lúa, A. J. (2011) Identificación molecular de hongos micorrizógenos arbusculares colonizando aguacatero bajo dos condiciones de manejo en Uruapan Michoacán. Tesis Maestría. UMSNH
- Mandemaker, A. 2007a. Review: Photosynthesis of avocado. New Zealand Avocado Growers Association Annual Research Report. 7, 1-10.
- Mandemaker, A. 2007b. Photosynthetic performance of overwintered leaves. New Zealand Avocado Growers Association Annual Research Report. 7, 11-20.
- Mataré, R. y Hatting, M. J. (1978). Effect of mycorrhizal status of avocado seedlings on root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant and soil.* 49 433-435.
- Medina-Torres, R., S. Salazar-García, M. Ortiz-Catón y R. Valdivia-Bernal. 2011. Variación estacional de la fotosíntesis en varios cultivares de aguacate. *Revista Biociencias.* 1(3). 36-45.
- Melo, H. Y. P. (2011) Respuesta de la inoculación de micorrizas en plántulas de aguacate *Persea americana* Mill variedad Hass en diferentes sustratos. Tesis Maestría, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- Mena-Violante, H., Ocampo-Jiménez, O., Dendooven, L., Martínez-Soto, G., González-Castañeda, J., Davies, Jr. F. T., Olalde-Portugal, V. (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance fruit growth and quality of chile ancho (*Capsicum annum* L. cv San Luis) plants expose to drouht. *Mycorrhizal* 16:261-267 Pp.

- Menge, J. A., LaRue, J., Labanauskas, C. K., y Johnson, E. L. V., (1980) The effect of two Mycorrhizal Fungi upon growth and nutrition of avocado seedlings grown with Six fertilizer treatments. J. Soc. Hort. 105(3):400-404. University of California, Riverside, CA.
- Miller G. L., (1959) Analytical Chemistry . 31, 426
- Miller, R. M. y Jastrow, J. D. (2000) Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: Arbuscular Mycorrhizas, Physiology and Function (eds Kapulnik, Y. & Douds, D.D.J.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 3–18.
- Molina, M., Medina, M. y Restrepo, L. F. (2006) Evaluación de sustratos y cultivos trampa bajo condiciones controladas para la obtención de hongos micorrízogenos de Aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.) en: Livestock Research for Rural Development 18 (2) 2006.
- Montañez, O. B. I. (2009) Efecto de la micorrización en plantas de aguacate (*Persea americana* L.) durante la fase de vivero en suelos provenientes de los Llanos Orientales. Tesis Maestría en Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D. C.
- Montaño, N., Camargo-Ricalde, S., García-Sánchez, R. y Monroy, A. (2007) Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos, eds. Mundi-Prensa SA de CV, UAM Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM: Distrito Federal, México. 460.
- Moreira, F. M. S. y Siquiera, J. O. (2006) Micorrizas (Capítulo 10). Pp 543-657. En: UFLA (Lavras ed.). Microbiología e Bioquímica do Solo, 2da edn. 729 pp.
- Morton, J. B. (2002) International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. West Virginia University. <http://www.invam.caf.wvu.edu/>.
- Mosse, B. (1973) Advances in the study of vesicular- arbuscular mycorrhiza. Annu. Rev. Phytopathology 11:171 - 196.
- Navarro, G. H. (2009) Agricultura Orgánica y Alternativa Universidad Autónoma de Chapingo. Primera edición. Chapingo Edo. de México. 271p
- Newsham, K. K., Fitter, A. H., Watkinson, A. R. (1995) Arbuscular Mycorrhiza Protect an Annual Grass from Root Pathogenic Fungi in the field. Journal Ecol. 83: 991-1000

- NOM-021-RECNAT, 2000. (2002) SEMARNAT, Norma oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.
- Oehl, F., E. Sieverding, K. Ineichen, E. Ris, T. Boller, y A. Wiemken (2005). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist*. 165: p. 273-283.
- Ohtomo, R., y Saito, M. (2005) Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol*. 167: 571–578.
- Olalde, P. V. y Aguilera, G. L. I. (2007). Microorganismos y Biodiversidad. *Terra* 16:3: 289-292
- Öpik, M., M. Moora, M. Zobel, U. Saks, R. Wheatley, F. Wright, y T. Daniell (2008). High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest *New Phytologist* 179: p. 867-876.
- Ozgonen, H., y Erkilic, A., (2007) Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* L.) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop Protec.* 26: 1682–1688.
- Paz-Vega, S. 1997. Alternate bearing in the avocado (*Persea americana* Mill.). *California Avocado Society Yearbook*. 81, 117-148.
- Peipp, H., Maier, J., Schmidt, J., Wray, V., and Strack, D. (1997). Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochemistry*. 44(4,) 581-587.
- Peterson, R. L., Massicotte, H. B., y Melville, L. H. (2004) *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press, Ottawa, Ont.
- Philips, J. M. y Hayman, D. S. (1970) 'Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection', *Transactions of the British mycological Society*, vol. 55, pp. 158–161.
- Porra, R. J, Thompson, W. A. y Kriedemann P. E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975 (1989) 384-394. Elsevier.

- Pozo, M. J. y Azcón-Aguilar C. (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10:193-398-
- Remy, W., Taykis, N., Hass, T., Hagen, y Corp. Hans. (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular micorrizae. *Plant Biology*. 91:11841-11843.
- Reyes, A. J. C., Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. (1997) Aspectos relacionados sobre el uso de la endomicorriza arbuscular en aguacate (*Persea americana* Mill) Memoria 1997. CICTAMEX. "Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México. Coatepec Harinas, México.
- Rillig, M. C. y Mummey, D. L. (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol* 171: 41-53.
- Rivera, E., Ramón, A., Cárdenas, M., Víctor, J., Calderón, P. A. y Torrez, H. A. (2011) Utilización de cepas eficientes de hongos micorrizicos arbusculares en el desarrollo de portainjertos de aguacate en un sustrato suelo-cachaza Vol.32, No. 2 pp 172-183.
- Roveda, G., Cabra, L., Ramírez, M., y Peñaranda, A. (2007) Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la aclimatación y endurecimiento de microplántulas de mora (*Rubus glaucus*) *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8(1) 28-36
- Ruiz-Lozano, J. M., Azcón, R., Gómez, M. (1995) Effects of Arbuscular Mycorrhizal Glomus Species on Drought Tolerance: Physiological and Nutritional Plant Responses. *Applied and Environmental Microbiology* 61:456–460.
- Salamanca, S. C. R., y Cano, S. C. A. (2005) Efecto de las micorrizas y el sustrato en el crecimiento vegetativo y nutrición de cuatro especies frutales y una especie forestal, en la fase de vivero, en el municipio de Restrepo-Meta, Colombia. En: Encuentro Nacional de la Ciencia del Suelo "Materia orgánica y microorganismos en la agricultura Colombiana Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Medellín, 2005. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA).
- Salas, E. y Blanco, F. (2000) Selección de plantas hospederas y efectos del fósforo para la producción de inoculo de hongos formadores de micorrizas Arbusculares por el método de cultivo en macetas. *Agronomía Costarricense*. 24: 19-28.
- Salazar, G. S. (2002) Nutrición del aguacate, principios y aplicaciones. Primera Edición INIFAP, INPOFOS. Querétaro, Qro. 165 pp.

- Sánchez, P. C. J., Alcanzar, R. J. J. Coria, A. V. M., Anguiano, C. J., Vidales, F.I., Tapia, V. L. M., Aguilera, M. J. L., Hernández, R. G. y Vidales, F. J. A. (2001) Tecnología para la producción de aguacate en México. Libro técnico No. 1/División Agrícola. INIFAP. C. E. Uruapan. CIR Pacífico Centro. 208 Pp.
- Sánchez, R, G. (2007) El Cluster del aguacate de Michoacán, desarrollo regional para el liderazgo global. Fundación produce Michoacán 241p.
- Sánchez-Romero, C., Perán-Quesada, Barceló-Muñoz, R. A., Pliego-Alfaro F. Variations in storage protein and carbohydrate levels during development of avocado zygotic embryos. *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 1043–1049.
- Sawers, R.J., Yang, S., Gutjahr, C. y Paszkowski, U. (2008) The molecular components of nutrient exchange in arbuscular mycorrhizal interaction. En: *Mycorrhizae; Sustainable Agriculture and Forestry*. 37-59 p Springer Science.
- Schaffer y Whiley, 2002; Schaffer, B. y A. Whiley. 2002. Capítulo 6. Environmental physiology. pp. 133-154. En: Whiley, A., B. Schaffer y B. Wolstenholme (ed.). *The avocado, botany, production and uses*. Primera edición. CABI Publishing, Londres.
- Schaffer y Whiley, 2003) Schaffer, B. y A. Whiley. 2003. Environmental regulation of photosynthesis in avocado trees - A mini-review. pp. 335-342. En: *Proceedings V World Avocado Congress*, Malaga, España.
- Schüßler, A. y Walker, C. (2010) The Glomeromycota: A species list with new families and new genera. En Gloucester, England. 57p. en línea: http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/species_infos/higher_taxa
- Schüßler, A., y Kluge, M. (2001) Geosiphon pyriforme, an endocytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for AM research. In: Hock B. (ed.). *The Mycota*. Vol. IX. Fungal Associations, 151-161. Springer, Berlin.
- Schüßler, A. y Walker, C. (2010) The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. www.amfphylogeny.com.
- Shaul, O., Galili, S., Volpin, H., Ginzberg, I., Elad, Y., Chet, I. y Kapulnik, Y. (1999) Mycorrhiza induced changes in disease severity and PR protein expression tobacco leaves. *Mol. Plant Microbe Inter.* 12: 1000–1007.

- SIAP, (2011) Servicio de Información y Agroalimentaria y Pesquera, en línea: www.siap.sagarpa.gob.mx;http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=56.
- Siddiqui, Z. A. y Akhtar, M. S. (2008) Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. En: Sustainable Agriculture and Forestry Springer Science+ Business Media B. V. 91-97
- Sieverding, E. (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. GTZ, Eshborn, Germany.
- Sieverding, E. y Oehl, F. (2006) Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal *Glomeromycetes*. J. Appl. Bot. Food Qual. 80: 69-81.
- Sieverding, V. (1990) Efecto de la micorrizas arbustivas en Café (*Cafelea arabiga*). Acta Agronómica 40(2): 89 – 99
- Silveira, S. V., De Sousa, P. V. D., Koller, O. C. y Schwarz, S. F. (2003) Elementos minerales y carbohidratos en plantones de aguacate “Carmen” inoculados con micorrizas arbusculares. Libro de Actas V Congreso Mundial del Aguacate: (2): 415 - 420.
- Slatyer, R.(1967) Plant water relationships. N.Y. Academic Press. Cap. 5. 1967.
- Smith, S. E., Smith, F. A. y Jakobsen I. (2003) Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses Plant Physiology, September 2003, Vol. 133, pp. 16–20.
- Smith, S. E., y Read, D. J. (1997) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. Harcourt Brace & Company, Publishers. San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Smith, S. y Read D. (2008). Mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry en Mycorrhizal Symbiosis, Academic Press:London. p. 121-143.
- Somers, E., y Vanderleyden, J. (2004) Rhizosphere bacterial signalling; a love parade beneath our feet. Critical reviews of Microbiology 30: 205-240.
- Stutz, J. C. y Morton, J. B. (1996) ‘Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems’, Canadian Journal of Botany, vol. 74, pp. 1883–1889.
- Stutz, J. C. y Morton, J. B. (1996) ‘Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems’, Canadian

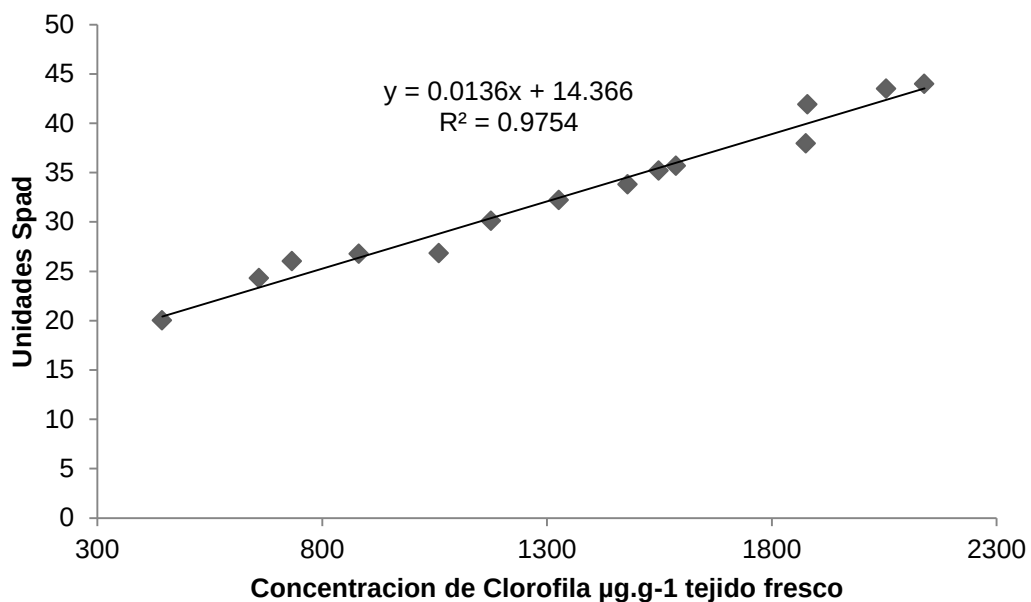
- Journal of Botany, vol. 74, pp. 1883–1889. En Manual de biología de suelos tropicales. Capítulo 7.
- Sylvia, D.M. (1999) Fundamentals and applications of arbuscular mycorrhizae: a "biofertilizer" perspective, (on line). <http://dmsylvia.ifas.ufl.edu>
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. Tercera Edición. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 764 p.
- Tapia, J., (2003). Identificación de HMA aislados de suelos salinos y su eficiencia en plantas de (*Lactuca sativa* L.). Tesis Doctorado, Universidad de Colima
- Téliz, D. y Mora, A. (2007) El aguacate y su manejo integrado 2da edición, ediciones Mundi Prensa, México D.F. 319p.
- Trejo, D., Ferrera-Cerrato, R., García, R., Varela, L. y Alarcón, A. (2011) Efectividad de siete consorcios nativos de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de café en condiciones de invernadero y campo. Revista Chilena de Historia Natural 84: 23-31.
- Trotta, A., Varese, G. C., Gnani, E., Fusconi, A., Sampo, S., and Berta, G. (1996) Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. Plant Soil 185: 199–209
- Trouvelot, A., Kough, J. L. y Gianinazzi-Pearson, V. (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En : Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (eds.). INRA Press, Paris, pp. 217-221.
- Varela, F. L. y Trejo, D. (2001) Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. Acta Zoológica Mexicana 1: 39-51.
- Vidal, M. T., Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M. y Pliego-Alfaro, F. (1992) Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. HortScience, 27: 785-787.
- Westover, K., Kennedy, A., y Kellys, S. (1997) Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. Journal of Ecology, 85: 863-873.

- Whiley, A. 1990a. CO₂ assimilation of developing fruiting shoots of cv Hass avocado (*Persea americana* Mill). South African Avocado Growers Association Yearbook. 13, 28-33.
- Whiley, A. W., Schaffer, B. y Wolstenholme, B. N. (2002) The avocado: botany, production, and uses. CABI Publishing. ISBN 0851993575.
- Whiley, W. 1994. Ecophysiological studies and tree manipulation for maximization of yield potential in Avocado (*Persea americana* Mill.). PhD Thesis University of Natal.
- Schaffer, B., A. Whiley y R. Kohli. 1991. Effects of leaf age on gas exchange characteristics of avocado (*Persea americana* Mill.). Scientia Horticulturae. 48: 21-28.
- Wolstenholme, B. y A. Whiley. 1999. Ecophysiology of the avocado (*Persea americana* Mill.) tree as a basis for pre-harvest management. Revista Chapingo Serie Horticultura 5, 77-88.
- Wolstenholme, B. 1987. Some aspects of avocado research world-wide. South African Avocado Growers Association Yearbook. 10, 8-12.
- Wolstenholme, B. y A. Whiley. 1995. Strategies for maximising avocado productivity: An overview. pp 61-70. En: Proceedings III World Avocado Congress. Israel.
- Xuan, L., P. Robinson, M. Madore, G. Witney y M. Arpaia. 1999b. 'Hass' avocado carbohydrate fluctuations. II. Fruit Growth and Ripening. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124(6), 676-681.
- Xuan, L., J. Sievert, M. Arpaia y M. Madore. 2002. Postulated physiological roles of the seven-carbon sugars, mannoheptulose, and perseitol in avocado. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127(1), 108-114.
- Xuan, L., P. Robinson, M. Madore, G. Witney y M. Arpaia. 1999a. 'Hass' avocado carbohydrate fluctuations. I. Growth and phenology. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124(6), 671-675

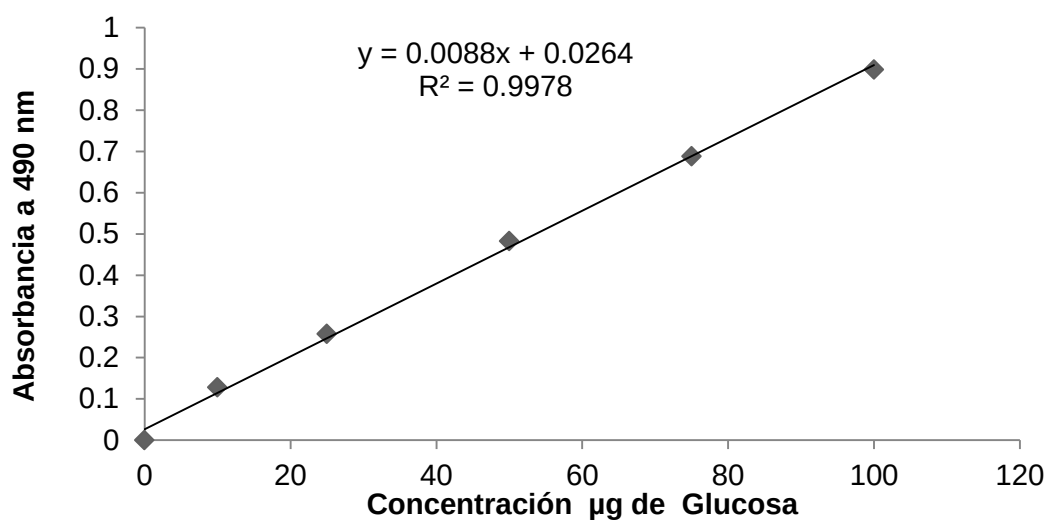
VII. ANEXOS

7.1 Gráficas de correlación

La curva patrón generada para la determinación de azúcares de $R^2 = 0.9978$.

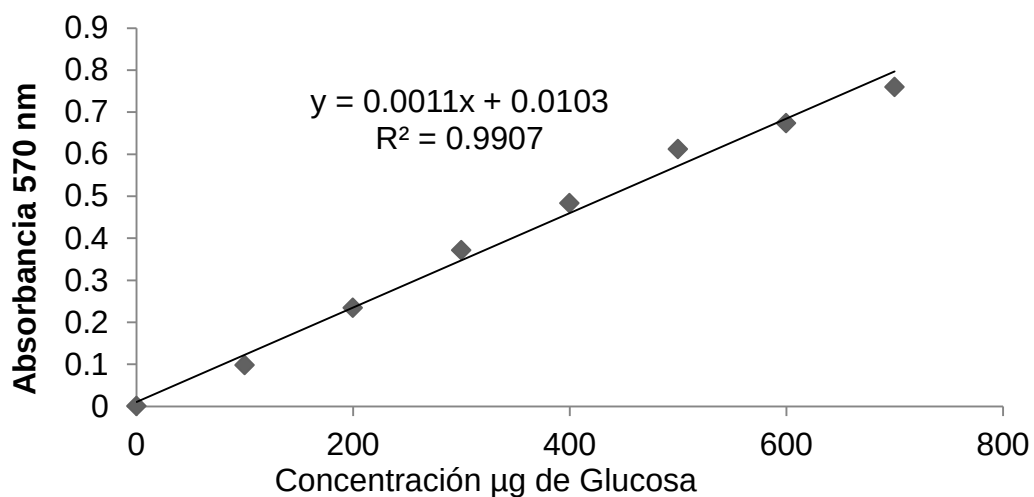


Gráfica correlación Unidades Spad y contenido de clorofila $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tejido fresco. Para calcular el contenido de clorofila en plántulas de aguacate mediante de Unidades Spad.



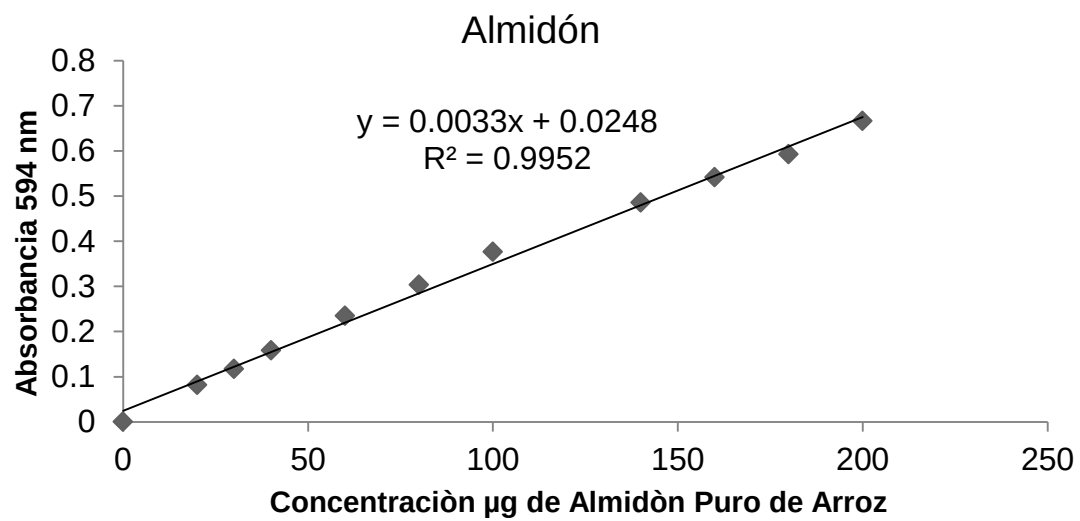
Grafica Curva de calibración para carbohidratos totales. Concentración μg de Glucosa con absorbancia a 490 nm para determinar Carbohidratos totales.

La curva patrón generada para el análisis de azúcares reductores mostró una correlación de $R^2 = 0.9907$ (Anexo III)



Grafica Curva patrón para azúcares reductores. Gráfica de la concentración μg de Glucosa con Absorbancia a 570 nm para calcular el contenido de Azúcares Reductores.

Correlacion entre la concentración de almidón y la absorbancia de diferentes concentraciones de almidón ($R^2 = 0.9952$).



Grafica Curva de calibración para almidón. Concentración µg de Almidón Puro de Arroz con la Absorbancia a 594 nm para determinar la cantidad de almidón.