

## Inoculación micorrízico arbuscular en portainjertos de plantas de aguacate cv 'Hass' en viveros de Michoacán, México\*

### Arbuscular mycorrhizal inoculation in avocado rootstocks cv 'Hass' in nurseries of Michoacán, Mexico

Yazmín Carreón Abud<sup>1§</sup>, Salvador Aguirre Paleo<sup>2</sup>, Mayra E. Gavito<sup>3</sup>, Dorian Javier Mendoza Solís<sup>2</sup>, Raúl Juárez Chávez<sup>2</sup>, Miguel Martínez Trujillo<sup>1</sup> y Dora Trejo Aguilar<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Avenida Francisco J. Mujica S/N Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México. Tel: (443) 3 22 35 00. Ext. 4224. Fax: (443) 3 04 08 09. <sup>2</sup>Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. <sup>3</sup>Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. <sup>4</sup>Laboratorio de Organismos Benéficos. Universidad Veracruzana. [aguirrepaleo@hotmail.com](mailto:aguirrepaleo@hotmail.com), [mgavito@cieco.unam.mx](mailto:mgavito@cieco.unam.mx), [mgavito@oikos.unam.mx](mailto:mgavito@oikos.unam.mx), [doratrejo@gmail.com](mailto:doratrejo@gmail.com). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: [ycabud@gmail.com](mailto:ycabud@gmail.com)/[codigogenetico@gmail.com](mailto:codigogenetico@gmail.com).

#### Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el desempeño de 12 inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el desarrollo de portainjertos de plantas de aguacate cv. 'Hass' en etapa de vivero. El experimento fue llevado a cabo en Uruapan, Michoacán, México, utilizando plantas de 60 días de edad, recientemente injertados. Los 12 tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar, con 6 repeticiones: A) *Gigaspora gigantea*; B) *Acaulospora delicata*; C) *Rhizophagus fasciculatus* (foráneo); D) Consorcio de Veracruz MTZ1-UV; E) *Rhizophagus fasciculatus*; F) *Rhizophagus irregularis* 28-A; G) comunidad nativa de AMF; H) *Rhizophagus irregularis* (MUCL); I) *Rhizophagus fasciculatus* + *Azospirillum*; J) *Sclerocystis* aff. *rubiformis*; K) *Acaulospora laevis*; L) *Scutellospora pellucida*; y M) testigo. La altura de las plantas, diámetro de los tallos y número de hojas fueron medidos cada 2 semanas durante 5 meses, después de lo cual las plantas fueron cosechadas y se determinó el peso seco del tallo y de la raíz. Las mediciones periódicas a lo largo del experimento, demostraron que *Acaulospora delicata* y el testigo tuvieron un mejor desempeño en la altura de las plantas, *Scutellospora pellucida* en lo referente al diámetro

#### Abstract

The aim of this study was to evaluate the performance of twelve inoculants of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the development of avocado rootstock cv. 'Hass' in the nursery stage. The experiment was conducted in Uruapan, Michoacán, Mexico, using 60-days-old, newly grafted rootstocks. The 12 treatments were in a completely randomized design with 6 replications: A) *Gigaspora gigantea*; B) *Acaulospora delicata*; C) *Rhizophagus fasciculatus* (foreign); D) MTZ1-UV Consortium from Veracruz; E) *Rhizophagus fasciculatus*; F) *Rhizophagus irregularis* 28-A; G) Native AMF community; H) *Rhizophagus irregularis* (MUCL); I) *Rhizophagus fasciculatus* + *Azospirillum*; J) *Sclerocystis* aff. *rubiformis*; K) *Acaulospora laevis*; L) *Scutellospora pellucida*; M) Control. Plant height, stem diameter and number of leaves were measured every two weeks for 5 months, after which plants were harvested and shoot and root dry weight were also measured. Periodical measurements showed that *Acaulospora delicata* and the control performed better in terms of plant height, *Scutellospora pellucida* in terms of stem diameter and the control in the number of leaves along the experiment. At harvest, plants inoculated

del tallo y el testigo en el número de hojas. En la cosecha, las plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* 28-A y *Scutellospora pellucida* tuvieron 2 veces más peso del tallo y de la raíz con relación a los otros tratamientos. Además, se concluye que la inoculación del cuello de la raíz de las plantas recientemente injertadas, mostró respuestas claras a la inoculación con cepas eficientes de hongos micorrízicos, aunque pasaron 6 meses para que las diferencias fueran evidentes.

**Palabras clave:** aguacate, portainjertos, hongos micorrízicos arbusculares, vivero.

## Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un cultivo nativo de México y Centroamérica altamente rentable (Smith, 1966; Sánchez *et al.*, 2001). México es el mayor productor de aguacate en el mundo (SAGARPA, 2008) y Michoacán es el estado mexicano que contribuye con la mayor área cultivada y 80% de la producción nacional (Sánchez *et al.*, 2001; SAGARPA, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2010). El aguacate tiene gran importancia económica en Michoacán debido a los beneficios que genera entre los participantes de la cadena de producción, tales como los productores, comerciantes, industriales y consumidores, así como también los trabajadores permanentes y temporales que desarrollan el trabajo de la siembra y del manejo post cosecha (Téliz y Marroquín, 2007). Por cada 10 ha que se cultivan, se proporciona empleo a 1.5 personas (Sánchez *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2010).

Michoacán también produce millones de plantas de aguacate al año en vivero para satisfacer la demanda para nuevas plantaciones y para el mantenimiento de las huertas establecidas. Además, esto es un mercado rentable; las plantas son solicitadas y vendidas localmente o bien a otras regiones del país donde su calidad es altamente apreciada. Sin embargo, se han cuestionado las altas cantidades de fertilizantes y productos para el control de plagas. Existe la necesidad de implementar nuevas tecnologías de producción que reduzcan estos insumos, pero que mejoren la nutrición, salud, crecimiento, resistencia a patógenos y tolerancia a las condiciones adversas en el vivero y posteriormente en el campo.

Una alternativa para mejorar la producción es la aplicación de inoculantes microbianos, tales como los producidos a partir de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los cuales

with *Rhizophagus intraradices* 28-A and *Scutellospora pellucida* had twice as large shoot and root weights as the rest of plants. We conclude that stem collar inoculation of recently grafted plants showed clear responses to inoculation with efficient strains of mycorrhizal fungi even though it took over six months before differences became evident.

**Keywords:** avocado, arbuscular mycorrhizal fungi, nursery, rootstocks.

## Introduction

Avocado (*Persea americana* Mill.) is a highly profitable crop native to Mexico and Central America (Smith, 1966; Sánchez *et al.*, 2001). Mexico is the largest producer of avocado in the world (SAGARPA, 2008) and Michoacán is the Mexican state that contributes with the largest planted area and 80% of national production (Sánchez *et al.*, 2001; SAGARPA, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2010). Avocado has great economic importance in Michoacán because of the benefits it generates among the participants of the production chain, such as producers, traders, industrialists and consumers, as well as permanent and temporary workers for the work of cultivation and postharvest handling (Téliz and Marroquín, 2007). Every 10 ha of cultivation provide employment for 1.5 persons (Sánchez *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2010).

Michoacán produces as well millions of avocado plants per year in nurseries to meet the growing demand for new plantations and maintenance of established orchards. This is also a profitable market; plants are requested and sold locally or to other regions of the country where their quality is greatly appreciated. However, the high amount of fertilizers and pest control products used for plant production has been questioned. There is a need to implement new production technologies that reduce these inputs but improve nutrition, health, growth, resistance to pathogens and tolerance to adverse conditions in the nursery and later in the field.

One alternative to increase agricultural production is the application of microbial inoculants such as those produced from arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which play important functions through the establishment of a symbiosis with plant roots (Rivera *et al.*, 2011). Published reports on

tienen funciones importantes mediante el establecimiento de una simbiosis con las raíces de las plantas (Rivera *et al.*, 2011). Los reportes publicados acerca de ensayos de inoculación probando el efecto de inoculantes de HMA son escasos y han mostrado un rango amplio de respuestas, desde nulas hasta respuestas claras del crecimiento (Menge *et al.*, 1978, 1980; Silva y Siqueira, 1991; Vidal *et al.*, 1992; Reyes *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2002; Montañez, 2009; Montoya y Osorio, 2009). El presente estudio se llevó a cabo para evaluar el desempeño de una amplia variedad de inoculantes micorrízicos, incluyendo cepas de HMA nativas, foráneas, comerciales y no comerciales, sobre el desarrollo de portainjertos de aguacate cv 'Hass' en etapa de vivero. Se consideró que los inoculantes locales serían más efectivos que los inoculantes foráneos en la promoción del crecimiento de plantas de aguacate, asumiendo que los primeros estarían mejor adaptados para competir con los hongos micorrízicos nativos.

## Materiales y métodos

### Descripción del área de estudio

El experimento se llevó a cabo en un vivero localizado en Uruapan, Michoacán, México, con un clima templado húmedo con abundantes lluvias en verano y una temperatura promedio de 17.9-19.7°C y una precipitación anual de 1 200-1 600 mm (Gutiérrez, 2010). Las plantas de 60 días de edad fueron obtenidas de la germinación de semillas de una variedad nativa de aguacate "criollo", las cuales se habían injertado recientemente con la variedad 'Hass'.

### Producción de inoculantes micorrízicos

La inoculación se llevó a cabo con 12 cepas o consorcios de hongos micorrízicos provenientes de diferentes fuentes. Los inoculantes locales utilizados se obtuvieron directamente del suelo de los bosques templados, huertas de aguacate ó campos de maíz del estado de Michoacán, mediante el establecimiento de cultivos puros y propagación posterior en macetas. Las esporas fueron extraídas del suelo por decantación y tamizado húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963), seguido por una centrifugación en gradiente de sacarosa al 60% (Walker y Vestberg, 1994). Los morfotipos de esporas se separaron con base en el tamaño, color, forma y

inoculation trials testing the effect of AMF inoculants on avocado plants are scarce and have shown a wide range of responses, from none to clear growth responses (Menge *et al.*, 1978, 1980; Silva and Siqueira, 1991; Vidal *et al.*, 1992; Reyes *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2002; Montañez, 2009; Montoya and Osorio, 2009). The present study was conducted to evaluate the performance of a wide variety of mycorrhizal inoculants, including local, foreign, commercial, and non-commercial strains of arbuscular mycorrhizal fungi on the development of rootstocks of avocado cv 'Hass' in the nursery stage. We expected the local inoculants to be the most effective at promoting avocado growth, assuming they were better adapted to the local soil and would compete better with the native mycorrhizal fungi than non-local inoculants.

## Material and methods

### Overview of the Study Area

The experiment took place in a nursery located in Uruapan, Michoacán, México, with humid temperate climate with abundant rains in summer and an average temperature of 17.9-19.7°C and 1200-1600mm annual rainfall (Gutiérrez, 2010). Plants were 60-days-old, obtained from the germination of "criollo" (native varieties of avocado) seeds, and had been recently grafted with 'Hass' variety.

### Mycorrhizal inoculant production

The inoculation was performed with 12 strains or consortia of mycorrhizal fungi from different sources. The local inoculants used were obtained directly from soil of temperate forests, avocado orchards or maize fields in Michoacán, through the establishment of pure cultures and further propagation in pots. Spores were extracted from soil by wet sieving and decanting (Gerdemann and Nicolson, 1963), followed by sucrose gradient centrifugation 60% (Walker and Vestberg, 1994). Spore morphotypes were separated based on size, color, shape and presence or absence of supporting hyphae and mounted on permanent slides. Species identification was performed using keys and original descriptions found in Schenck and Pérez (1990) and public data bases on the web following the taxonomical arrangement by Schußler *et al.* (2001). Morphotypes showing greater

presencia o ausencia de hifas de soporte y se montaron en laminillas permanentes. La identificación de especies se llevó a cabo utilizando claves y descripciones originales reportadas en Schenck y Pérez (1990) y bases de datos públicas de la red de internet, siguiendo el arreglo taxonómico propuesto por Schußler *et al.* (2001). Los morfotipos que mostraron mayor abundancia de esporas en buenas condiciones fueron seleccionados para su aislamiento en cultivos puros. Las esporas fueron utilizadas para inocular plantas hospederas de las especies *Medicago sativa*, *Zea mays* y *Brachiaria decumbens*, crecidas en suelo estéril en tubos de PVC, macetas ó cajas de Petri con minirizotrones (Ortega-Larrocea *et al.*, 2008). La presencia de micorrizas fue examinada después de algunas semanas en las raíces muestreadas y se hizo una tinción con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970). Los otros inoculantes utilizados fueron comerciales ó bien no comerciales donados por otros investigadores. Los detalles de cada inóculo se presentan en el Cuadro 1.

### Diseño experimental

Los inoculantes probados fueron aplicados alrededor de la base del tallo después de remover parte del suelo y exponiendo el cuello de la raíz. Cada inoculante fue aplicado utilizando una suspensión con 400 g de suelo de las macetas de propagación, diluidos en 4 L de agua para cada planta. Posteriormente la raíz se cubrió nuevamente con el mismo suelo. Los testigos se sometieron al mismo procedimiento pero recibieron sólo 4 L de agua estéril. Es importante mencionar que los portainjertos de aguacate ya tenían suelo del campo utilizado en el vivero, por lo que contenían la microbiota nativa del suelo tipo Andosol, llamado “Topuri”. Por lo tanto, los inoculantes adicionados debieron interactuar y competir con los microorganismos nativos. Los tratamientos fueron asignados y distribuidos en un diseño completamente al azar, con 3 repeticiones. Cada unidad experimental consistió de 2 plantas en bolsas separadas, de manera que  $n=6$ . La variables altura de la planta (cm), diámetro del tallo (mm) y número de hojas fueron medidas cada 2 semanas, aproximadamente. Los pesos secos del tallo y de la raíz (g) fueron determinados después de la cosecha, a los 205 días después de la inoculación, lo cual representó el tiempo en que las plantas de un año de edad pueden ser vendidas y transferidas a las huertas.

abundance of spores in good conditions were selected for isolation in pure cultures. Spores were used to inoculate host plants *Medicago sativa*, *Zea mays*, and *Brachiaria decumbens* grown in sterilized soil in PVC tubes, pots, or minirhizotron Petri plates (Ortega-Larrocea *et al.*, 2008). Presence of mycorrhizae was examined after some weeks in roots sampled and stained with Trypan blue (Phillips and Hayman, 1970). The other inoculants used were either non-commercial donated by other researchers or commercial inoculants. The details of each inoculum can be found in Table 1.

**Cuadro 1. Nombre científico o comercial y origen de los inoculantes evaluados en plantas de aguacate.**  
**Table 1 Scientific or commercial name and origin of the inoculant evaluated in avocado plants.**

Inoculación Tratamiento	Nombre	Origen
1	<i>Gigaspora gigantea</i>	Campos de maíz, Michoacán
2	<i>Acaulospora delicata</i>	Campos de maíz, Michoacán
3	<i>Rhizophagus fasciculatus</i>	Inóculo comercial foráneo
4	Consorcio MTZ1- UV con > 8 spp	Veracruz, México
5	<i>Rhizophagus fasciculatus</i>	Inóculo comercial, México
6	<i>Rhizophagus irregularis</i> 28-A	Aarhus University, Denmark
7	Comunidad nativa Jujucato	Huertas de aguacate en Jujucato, Michoacán
8	<i>Rhizophagus irregularis</i> (MUCL)	Cultivo comercial <i>in vitro</i> , Canadá
9	<i>Rhizophagus fasciculatus</i> + <i>Azospirillum</i>	Inóculo comercial de insumos agropecuarios de Michoacán
10	<i>Sclerocystis</i> aff <i>rubiformis</i>	Huertas de aguacate, Zacán, Michoacán
11	<i>Acaulospora laevis</i>	Campos de maíz, Zacán, Michoacán
12	<i>Scutellospora pellucida</i>	Bosque templado de pino, Zacán, Michoacán
13	Testigo	Sin inoculante

## Análisis estadístico

El análisis de varianza multivariado fue utilizado para determinar el efecto de la inoculación de los diferentes tratamientos sobre las variables medidas periódicamente. El análisis de varianza univariado fue utilizado para examinar las diferencias en el tiempo de la cosecha. Las pruebas de Tukey se llevaron a cabo para determinar las diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos. El software Statistix 7.0 fue utilizado para las pruebas estadísticas.

## Resultados y discusión

Se encontraron respuestas significativas a la inoculación con los tratamientos, pero éstas fueron considerablemente diferentes entre las variables medidas periódicamente durante los primeros 5 meses después de la inoculación, puesto que ningún tratamiento fue consistentemente mayor o menor que los otros para todas las variables (Cuadro 2). Además, todos los valores se incrementaron con el tiempo, pero no hubo una interacción significativa entre la inoculación y el tiempo. La mayoría de las diferencias entre los tratamientos de inoculación fueron más bien pequeñas durante este periodo, pero llegaron a ser significativas en las 3 variables medidas. A lo largo del experimento, *Acaulospora delicata* y el tratamiento testigo se desempeñaron mejor en términos de la altura de la planta, *Scutellospora pellucida* en el diámetro del tallo y el testigo en el número de hojas (Cuadro 2).

## Experimental design

The inoculants tested were applied around the base of the stem after removing part of the soil and exposing the roots at the root collar. Each inoculant was applied using a suspension with 400 g soil from the propagation pots diluted in 4 L of water for each plant. Subsequently, the root was covered again with the same soil. Controls underwent the same procedure but received instead 4 L of sterile water. It is worth mentioning that since the potting media used to establish avocado rootstocks is field soil, all treatments contained the native soil microbiota of the Andosol, called "Topuri" used as potting media in the nursery. Therefore, the inoculants added should interact and compete with the native microorganisms. Treatments were assigned and arranged in a completely randomized design with 3 replications. Each experimental unit contained 2 plants in separated bags, so  $n=6$ . The variables plant height (cm), stem diameter (mm), and number of leaves were measured approximately every 2 weeks. Shoot and root dry weights (g) were measured at harvest 205 days after inoculation which is the time when 1-year-old-plants can be sold and transferred to orchards.

## Statistical analysis

Repeated measures Analysis of Variance was used to explore the effects of the inoculation treatments on variables measured periodically. One-way ANOVA was used to examine differences at harvest time. Tukey tests were

**Cuadro 2. Medias totales para los principales efectos de los tratamientos con inóculos, sobre la altura de la planta, diámetro del tallo y número de hojas, resultantes de las mediciones periódicas registradas durante los primeros 5 meses después de la inoculación.**

**Table 2. Overall means for the main effects of the inoculum treatments on plant height, stem diameter and number of leaves, resulting from periodical measurements taken during the first 5 months after inoculation.**

Especies	Altura	Diámetro del tallo	Número de hojas
1 <i>Gigaspora gigantea</i>	52 cde	1.23 bc	23 bcd
2 <i>Acaulospora delicata</i>	61 a	1.28 ab	31 abc
3 <i>Rhizophagus fasciculatus</i>	58 abc	1.24 bc	29 abc
4 Consorcio MTZ1-UV	56 abcd	1.29 ab	26 abcd
5 <i>Rhizophagus fasciculatus</i>	58 abc	1.28 ab	29 abc
6 <i>Rhizophagus irregularis</i> 28-A	59 ab	1.27 ab	32 ab
7 Comunidad nativa Jujucato	48 e	1.17 c	17 d
8 <i>Rhizophagus irregularis</i> (MUCL)	54 bcde	1.21 bc	22 cd
9 <i>R. fasciculatus</i> + <i>Azospirillum</i>	53 bcde	1.29 ab	27 abcd
10 <i>Sclerocystis aff rubiformis</i>	50 de	1.18 c	18 d
11 <i>Acaulospora laevis</i>	58 abc	1.25 bc	27 abcd
12 <i>Scutellospora pellucida</i>	56 abcd	1.33 a	22 cd
13 Testigo	61 a	1.25 bc	34 a

Las diferentes letras dentro de las columnas indican diferencias significativas para  $p < 0.05$ .



Se necesitaron 2 meses para detectar las primeras diferencias significativas en la altura de las plantas y el número de hojas, pero el diámetro del tallo empezó a incrementarse un mes después de la inoculación (Cuadro 3). Todas las variables mostraron incrementos grandes entre el segundo y el cuarto mes, después de lo cual hubo pocos cambios o ninguno.

**Cuadro 3. Medias totales para los principales efectos del tiempo de inoculación sobre la altura de la planta, diámetro del tallo y número de hojas, resultantes de las mediciones periódicas registradas durante los primeros 5 meses después de la inoculación.**

**Table 3. Overall means for the main effects of time of measurement on plant height, stem diameter and number of leaves, resulting from periodical measurements taken during the first 5 months after inoculation.**

Días después de la inoculación	Altura	Diámetro del tallo	Número de hojas
15	43 e	1.08 e	9 d
30	43 e	1.12 de	9 d
45	44 e	1.17 d	10 d
60	46 e	1.24 c	12 d
75	53 d	1.28 bc	23 c
90	61 c	1.31 ab	33 b
105	67 b	1.35 a	43 a
120	71 ab	1.35 a	46 a
135	73 a	1.35 a	47 a

Las diferentes letras dentro de las columnas indican diferencias significativas para  $p < 0.05$ .

La biomasa de la raíz siguió el mismo patrón que la biomasa del tallo, de manera que sólo se presentan los datos para la última variable mencionada. En la cosecha, las plantas inoculadas con *Rhizophagus irregularis* 28-A y *Scutellospora pellucida* tuvieron un peso de la raíz y del tallo 2 veces mayor con relación al resto de las plantas (Figura 1). La inoculación con el consorcio Veracruz y el testigo fueron los tratamientos con la menor biomasa, mientras que los otros 9 inoculantes produjeron una mayor biomasa, que fue intermedia entre los 2 mejores inoculantes y los 2 tratamientos más bajos.

Las plantas inoculadas con *Rhizophagus irregularis* 28-A y *Scutellospora pellucida* mostraron pesos secos de la raíz y del tallo 3 veces mayores con relación al tratamiento testigo (Figura 1). *Acaulospora delicata*, *Acaulospora laevis*, *Sclerocystis rubiformis* y *Rhizophagus fasciculatus* + *Azospirillum* indujeron un incremento de 2 veces en la

performed to identify the statistically significant differences among treatment means. Statistical tests were performed with Statistix 7.0 Software.

## Results and discussion

There were significant responses to the inoculation treatments but these differed considerably among the variables measured periodically during the first 5 months after inoculation since no treatment was consistently higher or lower than the others in all variables (Table 2). Additionally, all values increased with time, but there was no significant inoculation and time interaction. Most differences among inoculation treatments were rather small during this period, but reached significance in the three variables measured. *Acaulospora delicata* and the control treatment performed better in terms of plant height, *Scutellospora pellucida* in terms of stem diameter and the control in the number of leaves along the experiment (Table 2).

It took two months to detect the first significant differences in plant height and number of leaves, but stem diameter began to increase one month after inoculation (Table 3). All variables showed large increases between the second and the fourth month and, after that, were changing very little or not at all.

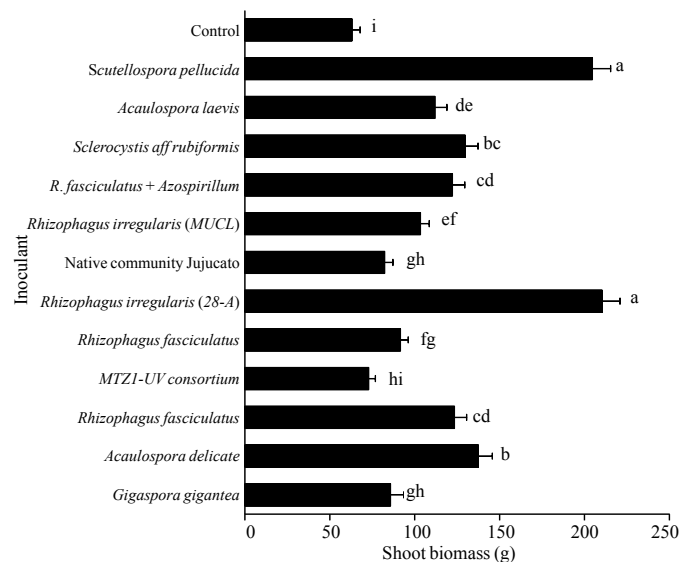
Root biomass followed the same pattern as shoot biomass so only shoot biomass data are shown. At harvest, plants inoculated with *Rhizophagus irregularis* 28-A and *Scutellospora pellucida* had twice as large shoot and root weights as the rest of plants (Figure 1). Inoculation with the Veracruz consortium and the control were the treatments with the lowest biomass, whereas the other nine inoculants produced a significantly larger biomass that was intermediate between the two best inoculants and the two lowest treatments.

The plants with inoculants *Rhizophagus irregularis* 28-A and *Scutellospora pellucida* showed shoot and root dry weights approximately three times higher than the control treatment (Figure 1). *Acaulospora delicata*, *Acaulospora laevis*, *Sclerocystis rubiformis* and *Rhizophagus fasciculatus* + *Azospirillum* induced a two-fold increase in plant biomass. Inoculation with *Rhizophagus irregularis* (MUCL), *Gigaspora gigantea*, *Rhizophagus fasciculatus* (foreign), *Rhizophagus fasciculatus* (Culiacán), and the orchard native mycorrhizal community had the lowest, but still significant, biomass increases compared to the control. Inoculation with consortium did not result in differences from the control treatment.

biomasa de las plantas. La inoculación con *Rhizophagus irregularis* (MUCL), *Gigaspora gigantea*, *Rhizophagus fasciculatus* (foráneo), *Rhizophagus fasciculatus* (Culiacán) y la comunidad micorrízica nativa de la huerta, tuvieron la biomasa más baja pero aún significativamente mayor con relación al testigo. La inoculación con el consorcio no mostró diferencias significativas con relación al testigo.

No hubo diferencias significativas hasta los 2 meses después de la inoculación en la mayoría de las variables medidas. Lo anterior pudo deberse a que las plantas responden positivamente a la inoculación en periodos de rápido crecimiento y porque tuvieron reservas de alimento suficientes provenientes de la semilla grande en las primeras etapas de desarrollo. Las semillas de aguacate “criollo” usualmente tienen un peso seco entre 10 y 25 g y contienen grandes cantidades de reservas. El nitrógeno y el fósforo, por ejemplo, representan en promedio 1-2% y 0.03-0.3%, respectivamente, de la masa seca del fruto (Bárceñas *et al.*, 2003) y las cantidades de N representan 1% aproximadamente del peso seco de la semilla (Weatherby y Sorber, 1931). Tal cantidad de nutrientes le permite a las plantas crecer bien entre 3 y 5 meses, dependiendo del tamaño, biomasa y calidad de la semilla, sin otros requerimientos más que luz y agua. La inoculación después del injerto ha mostrado hasta ahora las mejores respuestas, ya que las inoculaciones realizadas en la semilla, ya sea en la cama de semillas (Garcíarreal-Sánchez, 2012) o directamente en las primeras bolsas (Vega, 2011), no mostraron respuestas incluso después de 7-8 meses.

La efectividad del inoculante *Scutellospora pellucida* coincide por lo reportado por Vega (2011), quien aisló este hongo de una huerta de aguacate de la región de Zacán, Michoacán. Él aplicó el inoculante cubriendo la semilla, la cual fue germinada directamente en la primera bolsa y encontró que las plantas de aguacate inoculadas con este hongo tuvieron los mayores pesos secos de raíz y tallo durante la cosecha. Aunque éstas fueron sólo significativamente diferentes de manera marginal con relación a los otros tratamientos de inoculación, las plantas inoculadas con *Scutellospora pellucida* fueron las más cercanas a una diferencia significativa con respecto al testigo no inoculado después de 8 meses. Es importante mencionar que el mejor inoculante probado en ambos estudios, *Scutellospora pellucida*, probablemente consista de especies diferentes y probablemente nuevas especies desconocidas, ya que semeja a *Scutellospora pellucida*



**Figura 1. Efecto de los inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) sobre los pesos del tallo en las plantas de aguacate cosechadas.** (Media ± E.E., n=6). Las letras diferentes indican diferencias significativas para  $p < 0.05$ .

**Figure 1. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculants on shoot and root dry weight of avocado plants at harvest.** (Mean ± S.E., n=6). Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

There were no differences in most variables measured until two months after inoculation. This may be because the plant responds positively to inoculation in periods of high growth and because they have sufficient food reserves from the large seed in the early stages of plant development. “Criollo” avocado seeds usually weigh between 10 g and 25 g dry weight and contain large amounts of nutrient reserves. Nitrogen and phosphorus, for example, represent on average 1-2% and 0.03-0.3 %, respectively, of the fruit dry mass (Bárceñas *et al.*, 2003) and N accounts for approximately 1% of the seed dry mass (Weatherby and Sorber, 1931). Such a large amount of nutrients allow plants to grow well between 3 and 5 months, depending on the mass and quality of the seed, without requiring anything other than light and water (Gavito *et al.*, unpublished data). Inoculation after grafting has so far shown the largest responses since inoculations performed to the seed, either in the seed bed (Garcíarreal-Sánchez, 2012) or directly in the first bags (Vega, 2011), resulted in no responses even after 7-8 months.

The effectiveness of inoculant *Scutellospora pellucida* coincides with the report by Vega (2011), who isolated this fungus from an avocado orchard region in Zacán, Michoacán. He applied the inoculant by coating the seed,

en su morfología, pero no se ajusta completamente a su descripción y aunque la secuencia obtenida para este hongo se encuentra en el grupo de *Scutellospora*, no se alinea exactamente con las secuencias públicas disponibles en las bases de datos. Por lo tanto, el estudio de Vega (2011) es el otro que probó este hongo en particular y no haremos intentos de relacionar los resultados obtenidos con esta cepa con otros estudios que prueben aislados identificados como *Scutellospora pellucida*, hasta que su identidad taxonómica sea resuelta.

Silveira *et al.* (2003) probaron una variedad de especies de HMA sobre plantas de aguacate crecidas en suelos desinfectados y encontraron que otra especie de *Scutellospora*, *Scutellospora heterogama* fue el mejor promotor del crecimiento aunque otros inoculantes conteniendo especies de *Glomus* y *Acaulospora* fueron casi igual de buenos. Se ha argumentado que las especies que forman micelios y esporas grandes, tales como las especies de *Scutellospora*, demandan una gran transferencia de carbono para la mayoría de las plantas y la promoción del crecimiento con este tipo de especies de HMA son escasas. El hecho de que existen otros dos reportes que mencionan efectos positivos de estos hongos en plantas de aguacate, sugiere que esta especie arbórea es capaz de mantener a un hongo que potencialmente es demandante de carbono y beneficiarse de su asociación.

Las especies de *Glomus* (Montañez-Orozco, 2009; Rivera-Espinosa *et al.*, 2011), *Acaulospora* (Montañez-Orozco, 2009) y *Scutellospora* (Silveira *et al.* (2003) han mostrado efectos positivos sobre el crecimiento y la biomasa de plantas de aguacate jóvenes (Silveira *et al.*, 2003). Considerando que todas las plantas estuvieron micorrizadas (fueron crecidas en suelo fresco del campo), las grandes diferencias observadas con algunos de los tratamientos con inoculantes sugiere que la comunidad nativa del suelo utilizado para crecer las plantas no contenía cepas eficientes. Tampoco ocurrió con las cepas nativas de HMA de las huertas, introducida como uno de los inoculantes, lo cual es menos sorprendente en virtud de los altos niveles de fertilización utilizados en la mayoría de las huertas, lo cual tiende a seleccionar HMA resistentes a la alta fertilización y son frecuentemente consumidores del carbono de las plantas sin dar nada a cambio. El consorcio de especies (MTZ1-UV), que ha sido probado con una alta efectividad en varios cultivos incluyendo un árbol perenne, el café, sorpresivamente no fue diferente con respecto al testigo.

which was germinated directly in the first bag, and found that avocado plants inoculated with this fungus had the largest shoot dry weight mean values at harvest. Although they were just marginally significantly different from the other inoculation treatments, the plants inoculated with *Scutellospora pellucida* were the ones coming closer to a significant difference from the un-inoculated control after 8 months. It is worth mentioning that the best inoculant *Scutellospora pellucida* tested in both studies is probably a different species, and likely an unknown new species, since it resembles *Scutellospora pellucida* according to its morphology but does not fully comply with its description and the sequence obtained for this fungus was found to be in the *Scutellospora* group but did not match accurately any sequence available in public sequence data bases. Therefore, the study by Vega (2011) is the only other study testing this fungus in particular, and we will make no attempts to relate the results obtained with this strain to other studies testing isolates identified as *Scutellospora pellucida* until its taxonomic identity is resolved.

Silveira *et al.* (2003), who tested a variety of AMF species on avocado plants grown in disinfected soil, found also that another species of *Scutellospora*, *Scutellospora heterogama* was the best growth promoter although other inoculants containing *Glomus* and *Acaulospora* species were nearly as good. It has been argued that species forming large mycelium and spores, such as *Scutellospora* species, represent a large carbon drain for most plants and growth promotion reports with this type of AM fungal species are scarce. The fact that there exist already at least two other reports mentioning positive effects on avocado plants suggests this tree species is able to maintain a potentially carbon-demanding fungus and benefit from its association.

*Glomus* (Montañez-Orozco, 2009; Rivera-Espinosa *et al.*, 2011), *Acaulospora* (Montañez-Orozco, 2009) and *Scutellospora* species (Silveira *et al.* (2003) have shown positive effects on growth and biomass of avocado young plants. *Gigaspora* species have in turn produced negative effects on avocado (Silveira *et al.*, 2003). Considering that all plants were mycorrhizal (they were grown on fresh field soil), the large differences observed with some of the inoculation treatments suggest that the native soil community of the soil used to grow the plants did not contain efficient strains. Neither did the orchard native AMF community introduced as one of the inoculants, but this is less surprising in view of the high fertilization levels used in most orchards which tend to select AMF resistant to high fertility that are often consuming plant carbon without giving anything in exchange. The consortium



Nuestra expectativa de que los inoculantes locales tuvieran ventajas y fueran mejores promotores del crecimiento con relación a los inoculantes foráneos fue apoyada sólo parcialmente por nuestros resultados, ya que los mejores inoculantes fueron uno local y uno foráneo, y éste último de una región contrastante (Dinamarca). Hubo además una mezcla entre los otros inoculantes, con locales y foráneos, los que mostraron promociones del crecimiento más pequeñas, de manera que parece que la efectividad de los inoculantes estuvo más relacionada a su compatibilidad funcional con la planta que a su competitividad y adaptación en el contexto en que fueron probados. Aunque la simbiosis micorrízica arbuscular carece de especificidad taxonómica (Smith y Read, 2008), hay una compatibilidad funcional entre la planta, el hongo y el suelo, que resulta en combinaciones que trabajan mejor que otras (van der Heijden *et al.* 1988). La compatibilidad funcional fue evaluada en este trabajo sólo en términos del crecimiento de la planta, cuando hay otras variables que indican que la asociación es compatible.

Como los productores lo han sugerido, el diámetro del tallo fue la variable que mejor reflejó la biomasa final, pero esto pareció aplicarse sólo para unos pocos meses. Después de que las plantas pasaron el estado de rápido crecimiento, a los 1-2 meses, estas variables difícilmente cambiaron, por lo que no pudieron ser utilizadas posteriormente como indicadores. Éste estudio reveló que el desempeño de la inoculación sobre las plantas recién injertadas de aproximadamente 6 meses de edad, produjo las mayores respuestas de crecimiento que hemos observado en varios ensayos de inoculación realizados en diferentes etapas de crecimiento y con diferentes métodos, en plantas jóvenes de aguacate Vega (2011). Fue necesario esperar 6 meses para observar respuestas claras de algunos de los inoculantes, debido al crecimiento lento de las plantas de aguacate y los altos contenidos de reservas en las semillas que pueden mantener el crecimiento de las plantas por varios meses. Sin embargo, la inoculación de plantas injertadas no es una tarea simple de realizar en los viveros, ya que las plantas son muy grandes y las raíces se encuentran fuertemente empaquetadas en las bolsas de vivero, haciendo que la colocación del inóculo sea difícil e ineficiente. Es necesario probar otros métodos de inoculación, así como estados más apropiados de las plantas, para hacer la inoculación más eficiente y asegurar la producción de árboles micorrizados con simbiontes eficientes, que sean introducidos en las huertas junto con los beneficios que acompañan a una asociación simbiótica funcional.

of species (MTZ1-UV) which has proven high effectiveness on many crops, including coffee, a perennial tree, was surprisingly not different from the control.

Our expectation about the local inoculants having advantages and being better growth promoters than foreign inoculants was only partially supported by our results, since the best two inoculants were one local and one foreign, and the foreign was from a very contrasting region (Denmark). There was also a mixture of local and foreign among the other inoculants showing smaller growth promotions, so it seems that the effectiveness of the inoculants was more related to their functional compatibility with the plant than to their adaptation and competitiveness in the context they were tested. Although the arbuscular mycorrhizal symbiosis lacks taxonomic specificity (Smith and Read, 2008), there is some functional compatibility between plant, soil and fungus that results in combinations that work better than others (van der Heijden *et al.* 1988). Functional compatibility was evaluated here only in terms of plant growth, when there are other variables that indicate the association is compatible.

Stem diameter was, as producers have suggested, the variable that best reflected final biomass but this seemed to apply only for a few months. After plants had passed the 1-2 months stage of rapid development, these variables were hardly changing and could not be used as indicators any longer. This study revealed that inoculation performed on recently grafted plants, approximately 6 months old, resulted in the largest growth responses we have observed in several inoculation trials conducted at different growth stages and with different methods on young avocado plants (Vega, 2011, and unpublished results). Still it took until the plants were over six months to observe clear responses to some of the inoculants because of the slow growth of avocado and the large content of reserves in the seeds that can maintain plants growing for several months. Inoculating grafted plants is however not a simple task to be accomplished in the nurseries since plants are too big already and roots become tightly packed in the nursery bags making inoculum placement difficult and inefficient. Other inoculation methods and more appropriate stages to perform easy and efficient inoculation are yet to be tested in order to provide a suitable inoculation procedure that ensures the production of mycorrhizal trees inoculated with efficient symbionts to be introduced to orchards together with the benefits associated to a multifunctional symbiotic association.

## Conclusiones

Los mejores hongos micorrízicos fueron diferentes para cada una de las variables evaluadas. Sin embargo, se puede concluir que para la variable de diámetro del tallo es recomendable el uso de cepas de *Scutellospora pellucida*.

Los mejores inoculantes fueron 28-A *Rhizophagus irregularis* y *Scutellospora pellucida* ya que tuvieron un peso seco de la raíz y el tallo 2 veces mayor con relación al resto de las plantas.

Concluimos que la inoculación del cuello de la raíz de las plantas recientemente injertadas mostró respuestas claras a la inoculación con cepas eficientes de hongos micorrízicos, aunque fue necesario esperar 6 meses para que las diferencias fueran evidentes.

## Agradecimientos

Los y las autores(as) agradecen a los proyectos PROMEP-SEPrede de inoculantes micorrízicos y FOMIX-Michoacán 2009-115994 por el apoyo para esta investigación.

## Literatura citada

- Bárceñas, O. A. E.; Molina, E. J.; Huanosto, M. F. and Aguirre, P.S. 2003. Contenido de macro y microelementos en hojas, flor y fruto de aguacate "Hass" en la región de Uruapan, Michoacán. Actas V Congreso Mundial de Aguacate. pp 365-371.
- García-real-Sánchez, A. 2012. Evaluación de inoculantes micorrízicos y tratamientos de suelo para la producción orgánica de planta de aguacate (*Persea americana* Mill) en vivero. Thesis. Universidad Autónoma de México.
- Gerdemann, J. W. and Nicolson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 235-244.
- Gutiérrez-Contreras, M.; Lara-Chávez, M. B. N.; Guillén-Andrade, H. and Chávez-Bárceñas, A. T. 2010. Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. Interciencia. 35: 647-653.
- Menge, J., Davis, R. M.; Johnson, E. L. and Zentmyer, G.A. 1978. Mycorrhizal fungi increase growth and reduce transplant injury in avocado. California Agriculture. 32:6-7.
- Menge, J.; Larue, J.; Labanauskas, C. and Johnson, E. 1980. The effect of two mycorrhizal fungi upon growth and nutrition of avocado seedlings grown with six fertilizer treatments. J. Amer. Soc. Hort. Science. 105(3):400-404.

## Conclusions

Best mycorrhizal fungi were different for each variable evaluated. However one can conclude that for the variable of the stem diameter is recommended to use strains of *Scutellospora pellucida*.

Best inoculants were 28-A *Rhizophagus irregularis* and *Scutellospora pellucida* because they had twice as large shoot and root weights as the rest of plants.

We conclude that stem collar inoculation of recently grafted plants showed clear responses to inoculation with efficient strains of mycorrhizal fungi even though it took over six months before differences became evident.

## Acknowledgements

We wish to thank the projects PROMEP-SEP Mycorrhizal Inoculants Network and FOMIX- MICHOCAN 2009-115994 for funding this research.

*End of the English version*



- Montañez-Orozco, 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 (Colombia). Master Thesis. Universidad Nacional de Colombia.
- Ortega-Larrocea, M. P.; Morales-Vazquez, J. A. and García-Sánchez, R. 2008. Cultivo monospóricos de hongos micorrízicos arbusculares. En: Álvarez-Sánchez, J. y Monroy A.A. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y su implicación de la restauración. Facultad de Ciencias, UNAM. México. pp 69-83.
- Phillips, J. M. and Hayman, D. S. 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society. 55: 158-161.
- Reyes, J. C.; Ferrera-Cerrato, R. and Alarcón, A. 1998. Endomicorriza vascular, bacteria vermicomposta en plántulas de aguacate en vivero. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. Coatepec Harinas, México, pp. 12-22.
- Rivera Espinosa, R. A.; Martín Cárdenas, J. V.; Calderón Puig, A.; Torres Hernández, A. 2011. Utilización de cepas eficientes de hongos micorrízicos arbusculares en el desarrollo de portainjertos de aguacate en un sustrato suelo-cachaza. Cultivos Tropicales Vol. 32 (2) 172-183.

- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2008. Plan Rector Sistema Nacional Aguacate. Estadísticas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx).
- Sánchez, P. J. L.; Alcántar, R. J. J.; Coria, A. V. M.; Anguiano, C. J.; Vidales, F. I.; Tapia, V. L. M.; Aguilera, M. J.; Hernández, R. G. and Vidales, F. J. A. 2001. Tecnología para la Producción de aguacate en México. INIFAP. Libro Técnico N° 1. 208 p.
- Schenck, N. C. and Pérez, Y. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3a. ed. Published by Synergistic Publications. 286 p.
- Schüßler, A.; Schwarzott, S. and Walker, C. 2001. Analysis of partial Glomales SSU Rrna gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research* 105, 5-15.
- Silva, L. F. C. and Siqueira, J. O. 1991. Growth and nutrient contents of avocado, mango and papaya seedlings under the influence of different vesicular-arbuscular mycorrhiza fungal species. *Revista Brasileira de Ciencia do solo*. 15(3): 283-288.
- Silveira, S. V.; de Souza, P. V. and Koller, O. C. 2002. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de abacateiro Pesquisa agropecuaria brasileira. 37 (11) 1597-1604.
- Silveira, S. V.; de Souza, P. V. D.; Koller, O. C.; and Schwarz, S.F. 2003. Elementos minerales y carbohidratos en plántones de aguacate 'carmen' inoculados con micorrizas arbusculares. En *Actas V Congreso Mundial del Aguacate*. pp. 415-420.
- Smith, C. E. Jr. 1966. Archaeological evidence for selection in avocado. *Econ. Bot.* 20(2): 169-175.
- Smith S. E. and Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3a. Ed. Elsevier Ltd., London, England. 787 p.
- Téliz, O. D. and Marroquín, P. F. 2007. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. En Téliz OD, Mora A (eds.) *El aguacate y su manejo integrado*. 2ª ed. Mundi-Prensa. México. pp. 3-16.
- van der Heijden, M. G. A.; Klironomos, J. N.; Ursic, M.; Moutoglis, P.; Streitwolf-Engel, R.; Boller, T.; Wiemken, A. and Sanders, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- Vega, F. M. 2011. Diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares y potencial micorrízico de dos agroecosistemas y una zona natural del estado de Michoacán. Master Thesis. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Vidal, M. T., Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M. and Pliego-Alfaro, F. 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. *HortScience* 27(7): 785-787.
- Walker, C. and Vestberg, M. 1994. A simple and inexpensive method for producing and maintaining closed pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agricultural Science in Finland* 3: 233-239.
- Weatherby, L. B. and Sorber, D. G. 1931. Chemical composition of avocado seeds. *Industria and Engineering Chemistry*. 23: 1421-1423.