

Aislamiento y propagación de cultivos puros de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de huertas de aguacate con diferente manejo agrícola por la técnica de minirizotrófon

Yazmín Carreón-Abud¹, Eduardo Jerónimo-Treviño¹, María de los Ángeles Beltrán-Nambo¹
Miguel Martínez-Trujillo¹, Dora Trejo Aguilar², Mayra E. Gavito³

¹Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ²Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana
³CIEco, Universidad Nacional Autónoma de México

Isolation and propagation of pure cultures of arbuscular mycorrhizal fungi from avocado orchards by the minirhizotron technique

Abstract. The aim of this study was to isolate arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from soils of avocado orchards with different agricultural management and to propagate them through the minirhizotron technique. Soil was extracted directly from the study areas, using a completely randomized design and quantifying AMF species richness. Three of the most abundant species, *Rhizophagus* aff. *intraradices*, *Glomus* sp. 1 and *Sclerocystis rubiformis* were propagated by the minirhizotron technique, assessing mycorrhizal colonization after 20 and 40 days. This system proved to be most effective for propagation and mycorrhization of *Sclerocystis rubiformis* (18.5%) and *Rhizophagus* aff. *intraradices* and *Glomus* sp. 1 (7.7%). Minirhizotrons with a consortium of *Glomus* spp. and *Rhizophagus* aff. *intraradices* and a monospecific culture of *Sclerocystis rubiformis* were then transplanted to trap pots, for a period of four months. In the minirhizotron culture, the consortium was highly infective from the early stages, reaching 95% of mycorrhizal colonization in comparison with the pure culture of *Sclerocystis rubiformis* who showed percentages of 58% at the end of the experiment. Therefore the minirhizotron system used proved to be effective in the spread of mono- or multi-specific spore cultures *in vivo*.

Keywords: monospecific culture, infectivity.

Resumen. Se aislaron hongos micorrízicos arbusculares (HMAs) de suelos de huertas de aguacate con diferente manejo agrícola y se propagaron mediante la técnica de minirizotrófon. Se cuantificó la riqueza de especies de HMAs. Las especies más abundantes fueron: *Rhizophagus* aff. *intraradices*, *Sclerocystis rubiformis* y *Glomus* sp. 1 que se propagaron por la técnica minirizotrófon, evaluando la colonización micorrízica a los 20 y 40 días. Este sistema, resultó ser más efectivo para la propagación y micorrización de *Sclerocystis rubiformis* (18.5%) *Glomus* sp. 1 y *Rhizophagus* aff. *intraradices* (7.7%). Los cultivos minirizotrófon con un consorcio de *Glomus* spp. y *Rhizophagus* aff. *intraradices* y en cultivo monoespecífico de *Sclerocystis rubiformis*, se trasplantaron a macetas trampa durante cuatro meses. Mediante el cultivo minirizotrófon, el consorcio fue altamente infectivo desde las primeras etapas, alcanzando el 95% de colonización micorrízica, en comparación con el cultivo puro de *Sclerocystis rubiformis* que mostró porcentajes hasta de 58% al final del experimento. El sistema de minirizotrófon resultó ser efectivo para la propagación de cultivos multiespecíficos o monospóricos, *in vivo*.

Palabras clave: cultivo monoespecífico, infectividad.

Received 23 August 2012; accepted 15 May 2013.

Recibido 23 de agosto 2012; aceptado 15 de mayo 2013.

Autor para correspondencia: Yazmín Carreón Abud
ycabud@gmail.com

Introducción

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMAs) interactúan simbióticamente con el 80 % de las familias de plantas terrestres con las cuales son capaces de formar Micorrizas Arbusculares (MA), encontrándose en casi todos los ecosistemas terrestres (Smith y Read, 2008). Estos hongos, han sido utilizados en la agricultura, como bioinoculantes ya que favorecen la absorción de nutrimentos esenciales como el fósforo, el nitrógeno y agua, además brindan protección a la planta contra organismos patógenos. Para obtener éxito en la simbiosis entre el hongo y la planta es indispensable hacer una selección de la especie micorrízica a inocular, ya que diversas especies presentan diferente infectividad dependiendo del hospedero con el que se asocie, por lo que es importante conocer los HMAs de agroecosistemas específicos para reintroducirlos en dichos hábitats y promover el crecimiento vegetal (Cameron, 2010).

La propagación de cultivos puros de HMA, presenta muchas dificultades debido a la imposibilidad de cultivar hongos que forman esta simbiosis (Glomeromycota) en condiciones axénicas, pues hay que tomar en cuenta aspectos como la capacidad del hongo para completar su ciclo de vida con suficiente producción de esporas y de estructuras intraradicales, características del género o especies considerados (Declerck *et al.*, 2005). Por esta razón, la selección de inóculos de HMAs se hace indispensable para el aislamiento de nuevas cepas que permitan generar el inóculo adecuado, de acuerdo a la región y al tipo de planta que se desea producir para obtener mayores beneficios sin perturbar el medio ambiente (Hernández y Salas, 2009). Es por eso que se hace necesario extraer del suelo de interés dichos hongos, para propagarlos y después utilizarlos como bioinoculantes en los agroecosistemas con plantas micotróficas afines y compatibles con la micoflora del suelo. Las técnicas de

propagación de HMAs *in vivo* que se utilizan comúnmente, como son el cultivo trampa en maceta, el cultivo con diferentes sustratos, o el cultivo hidropónico, reducen significativamente la eficiencia del cultivo de hongos de una sola especie o de un conjunto reducido de especies (Ortega-Larrocea *et al.*, 2008), además de que presentan el riesgo de contaminarse con otras especies (Declerck *et al.*, 2005). La técnica de cultivo por minirizotrófon, ha recibido especial interés para caracterizar varios procesos biológicos tales como la producción de raíces finas, longevidad de raíces, incrementos en la colonización, reducir el parasitismo e incrementar las probabilidades de obtención de cultivos puros. El sistema reduce el área de crecimiento de raíces, incrementa la concentración de CO₂ de la atmósfera del sustrato y con ello promueve la ramificación de hifas germinativas incrementando la posibilidad de colonización. Posteriormente el sistema se trasplanta a macetas con el mismo sustrato en donde se incrementa el nivel del mismo y se promueve un mayor desarrollo vegetal, estimulando la esporulación (Ortega-Larrocea *et al.*, 2008).

El objetivo de este trabajo fue obtener cepas puras de HMA a partir de esporas aisladas directamente del suelo en huertas de aguacate con diferente manejo agrícola, su propagación por la técnica de minirizotrófon y medición de su capacidad infectiva (colonización micorrízica) para la obtención de inóculos que posteriormente, puedan utilizarse como fertilizantes biológicos.

Materiales y métodos

Área de muestreo

Se seleccionaron dos agroecosistemas correspondientes a huertas de aguacate, con diferente manejo agrícola (con dos repeticiones cada una: 1) huertas con manejo convencional, en donde se adicionan agroquímicos y 2) huertas con manejo

orgánico, sin adición de agroquímicos, pero con adición de compostas, herbicidas y fungicidas de origen orgánico. Se colectaron muestras de suelo de dos huertas de aguacate localizadas a las afueras de la zona urbana de la ciudad de Uruapan, unas en el predio denominado Huitzichio y las otras en el Puerto, en las cuales se lleva a cabo un manejo convencional y orgánico en huertos contiguos o pareados. La superficie de Huitzichio está ubicada en las coordenadas 19° 27' 09. 48" N, 102 00' 52.35" O, aproximadamente a 1.81 km al noreste de la ciudad de Uruapan y a una altitud de 1836 msnm; las coordenadas de El Puerto son 19° 22' 07.51" N, 102° 01' 27.88" O, a una altura de 1631 msnm, a 3.81 km hacia el sureste de la misma ciudad.

La edad de las huertas Huitzichio es de 30 años aproximadamente, el tipo de suelo predominante es Andosol, la vegetación original era bosque de pino y posteriormente se realizó el cambio de uso de suelo para el cultivo de maíz. Actualmente esta superficie se destina mayormente al cultivo de aguacate, aunque existen pequeñas áreas de hortalizas para el cultivo de chile, café y jitomate para autoconsumo. Desde su origen, una huerta se ha manejado de manera convencional con agroquímicos, la huerta contigua se ha trabajado por más de 10 años con manejo orgánico.

La edad de las huertas El Puerto es de 26 años aproximadamente, el tipo de suelo es Cambisol y su vegetación original también fue bosque de pino, realizándose

el cambio de uso de suelo para el cultivo de aguacate. A partir del año 2000 una huerta se maneja con productos orgánicos. En la zona aledaña de uso convencional se adicionan agroquímicos.

En ambas huertas con manejo orgánico y convencional se utilizan plantas de aguacate var. 'Hass'. En cada uno de los agroecosistemas se realizaron los análisis fisicoquímicos de los suelos, determinándose: a) el potencial de hidrógeno con la metodología MNX_AA-008-SCFI-2011; b) capacidad de intercambio catiónico, por la técnica de acetato de amonio; c) cantidad de materia orgánica por la técnica de Walkley y Black (1934); d) nitrógeno total por la técnica MNX-AA-026-SCFI-2001; y e) fósforo total por la técnica MNX-AA-029-SCFI-2001 (Tabla 1).

Toma de muestras

De cada una de las cuatro huertas de aguacate, se colectaron 10 Kg de suelo de la zona de uso orgánico y 10 Kg de la de uso convencional, las muestras se tomaron de la rizósfera de los árboles a una profundidad de entre 10-30 cm, realizando el muestreo al azar cubriendo toda el área correspondiente a cada zona. El material colectado se transportó en bolsas debidamente etiquetadas. Una vez en el laboratorio las muestras se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C para su posterior procesamiento y revisión.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los suelos en los agroecosistemas muestreados

Parámetros	Rancho Huitzichio		Rancho el Puerto	
	Huerta orgánica	Huerta convencional	Huerta orgánica	Huerta convencional
pH	7.0	6.5	6.6	6.9
Capacidad de intercambio catiónico	39	37.80	39.40	33.60
Materia orgánica %	12.10	7.45	11.94	9.80
Nitrógeno total %	0.83	0.55	0.60	0.64
Fósforo disponible ppm	21.86	13.89	19.0	18.68

Aislamiento, selección e identificación de esporas

A partir de las muestras obtenidas en el suelo directo de las huertas de aguacate se procedió a separar las esporas por el método de tamizado húmedo y decantación (Sieverding, 1991), seguido por centrifugación en gradiente de sacarosa al 60% (Walker y Vestberg, 1994). Se utilizaron tamices con apertura de malla de 1 mm, 400 μm y 40 μm para aislar esporas de diversos tamaños. Las esporas fueron aisladas bajo un microscopio estereoscópico, y se separaron en grupos, en base a características morfológicas tales como: tamaño, color, hifa de sostén y ornamentación principalmente. Se fijaron en alcohol polivinílico, ácido láctico y glicerol (PVLG), y mezclas de PVLG con el reactivo de Melzer (Brundrett *et al.*, 1996) para obtener preparaciones permanentes de los especies.

Para la clasificación taxonómica, se tomaron en cuenta las características morfológicas de las esporas, tales como color, tamaño, tipo y número de paredes de esporas, y la morfología de hifa de sostén en el punto de unión de la hifa, que fue observada al microscopio (Axiostar Zeiss) con aumentos de 100X y 400X.

La identificación de especies se llevó a cabo utilizando las claves de Schenck y Pérez (1990) e INVAM (International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular–Arbuscular Endomycorrhizal Fungi: www.invam.caf.wvu.edu) y las descripciones originales de Glomeromycota en la página web AMF PHYLOGENY (<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>).

Abundancia de especies

Se realizó el conteo de esporas al microscopio estereoscópico, usando una placa con cuadrícula de 4 x 4 mm, para las muestras extraídas de cada uno de los sitios de muestreo.

Cultivo en minirizotrófon (Fase 1)

Para realizar la inoculación se seleccionaron aquellos

morfotipos aislados que presentaron mayor abundancia de esporas, con la finalidad de propagar la mayor cantidad de réplicas posibles de un mismo inóculo. Para la Fase 1, en cada caja de Petri se inocularon de 8 a 10 esporas morfológicamente iguales, utilizando como planta trampa *Brachiaria decumbens*, y como sustrato se utilizó suelo estéril con vermiculita en proporción 3:1. Las cajas se sellaron y cubrieron con papel aluminio. El sistema se mantuvo por un periodo de tres meses regando una vez por semana con jeringas de 10 ml, en cámara de luz con un fotoperiodo de 12 horas luz/obscuridad. Después de este tiempo se extrajeron algunas raíces de cada una de las cajas y se analizó la colonización, aquellas cajas que resultaron positivas se llevaron a la Fase 2 de propagación en maceta trampa.

Cultivo en macetas trampa (Fase 2)

Para el montaje del sistema, que corresponde a la Fase 2, se utilizaron tubos de 30 cm de largo por 2.5 cm de diámetro con capacidad aproximada de 100 g, los cuales se lavaron y desinfectaron con cloro al 10%; se utilizó el mismo tipo de sustrato empleado para la etapa de minirizotrófon y como planta trampa se utilizaron plantas con abundante sistema radical perennes como fue el pasto *Brachiaria decumbens* y una planta de ciclo de corto que fue el jitomate (*Solanum lycopersicum*) en el mismo contenedor. Después de tres meses, se dejó de regar y una vez seca la parte aérea la planta fue cortada para dejar secar el suelo y promover la esporulación.

Determinación del porcentaje de colonización micorrízica

Durante el tiempo de propagación en la Fase 1, en sistema minirizotrófon se hicieron extracciones a los dos meses (tiempo 1) y a los cuatro meses (tiempo 2), de raíces de las plantas asociadas con los diferentes inóculos para evaluar la colonización micorrízica, lo cual se llevó a cabo mediante su tinción con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970) y

observación al microscopio electrónico de las estructuras características de esta asociación (hifas, arbusculos y vesículas). Se determinó el porcentaje de colonización mediante la técnica de McGonigle *et al.*, (1990). Los resultados fueron reportados como valores promedios por tipo de inóculo.

En el cultivo en maceta trampa Fase 2, se realizaron determinaciones periódicas (cada 15 días), por un periodo de 60 días, para cuantificar la colonización micorrízica.

Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y cuando fue apropiado, se realizó la prueba de Tukey, ambas a un nivel de significancia menor al 5%, por medio del programa FAUANL VERSION 2.5 (Olivares-Sáenz, 1994).

Resguardo de los HMA propagados

Para probar la identidad de los HMA propagados al final del experimento se realizaron montajes de esporas provenientes del cultivo puro para su identificación y comparación con los ejemplares provenientes de suelo directo a partir de los cuales se inició el cultivo. En el caso de este experimento se encontró una pureza del 80 al 90% en los dos cultivos obtenidos. Una vez corroborada su identidad se procedió al resguardo del material obtenido y sustrato de propagación de manera que al final se etiquetaron y almacenaron preparaciones fijas de cada una de las especies identificadas al principio del experimento provenientes de suelo directo y de esporas provenientes de los cultivos puros de las tres especies propagadas, contando con un total de 30 laminillas que se sellaron y almacenaron en cajas para portaobjetos. Los sustratos de propagación con los propágulos infectivos se colocaron en bolsas de plástico, se sellaron y etiquetaron de acuerdo a los criterios establecidos por el INVAM y se almacenaron a 4 °C en el Laboratorio de Genética y Microbiología de la Universidad Michoacana, Morelia, Michoacán México, y serán resguardadas en el

Centro de Recursos Genéticos Microbianos, CENARGEM, Jalisco, México, para posteriormente realizar pruebas de infectividad y efectividad, así como para futuras propagaciones y bajo un estricto control de calidad, poder ser utilizadas como bionoculantes.

Resultados

Riqueza de especies

En la huerta Huitzichio la riqueza de HMA fue mayor en las zonas con manejo orgánico en donde se encontraron nueve especies mientras que en la de uso convencional únicamente se aislaron cinco. En la huerta El Puerto el tipo de manejo no parece influir sobre la riqueza encontrada ya que el número de morfotipos o especies es semejante (de seis a siete), pero menor al valor encontrado en la zona de la huerta Huitzichio con manejo orgánico (Tabla 2).

Las especies que se comparten en los sitios analizados corresponden a los géneros *Glomus*, *Sclerocystis* y *Funneliformis*, antes incluidas en el género *Glomus*, *S. rubiformis*, *F. geosporus* y *Glomus* sp.3 se presentaron en las cuatro zonas analizadas, seguidas por *Glomus* sp.1 presente en tres sitios.

Abundancia de especies

Las especies más abundantes correspondieron a las especies a *Rhizophagus* aff. *intraradices*, *Glomus* sp.3 y *Pacispora* sp. con 650, 500 y 250 esporas g⁻¹ suelo respectivamente. Le siguen en abundancia *S. rubiformis* y *F. geosporus* con 80 y 65 esporas g⁻¹ suelo, que aun cuando presentan menor número de individuos, son especies que están presentes en las cuatro huertas muestreadas. (Tabla 3). No todas las especies encontradas en los sitios (Tabla 2) fueron susceptibles de medir su abundancia, ya que se encontraron sólo individuos escasos.

Tabla 2. Riqueza de especies encontradas en los cuatro sitios de muestreo

Especies	Rancho Huitzichio		Rancho el Puerto	
	orgánica	convencional	orgánica	convencional
<i>Sclerocystis rubiformis</i>	x	x	x	x
<i>Funnelliformis geosporum</i>	x	x	x	x
<i>Glomus</i> sp. 1	x		x	x
<i>Glomus</i> sp. 2			x	
<i>Glomus</i> sp. 3	x	x	x	x
<i>Rhizophagus</i> aff. <i>intraradices</i>	x			
<i>Acaulospora delicata</i>		x		
<i>Acaulospora mellea</i>		x		
<i>Ambispora leptoticha</i>				x
<i>Pacispora</i> sp.	x		x	
<i>Gigaspora decipiens</i>				
<i>Racocetra gregaria</i>	x			
Morfotipo 1 (naranja lisa)				x
Morfotipo 2 (café oscura rugosa)	x			
Morfotipo 3 (amarillo cremosa)	x			x
Total de especies/sitio	9	5	6	7
Especies únicas	4	2	2	2

Tabla 3. Abundancia de esporas de HMA de los sitios muestreados

Especies	No. de esporas /g suelo
<i>Sclerocystis rubiformis</i>	80 a
<i>Funnelliformis geosporum</i>	65 a
<i>Glomus</i> sp.1	50 a
<i>Glomus</i> sp. 3	500 b
<i>Rhizophagus</i> aff. <i>intraradices</i>	650 b
<i>Acaulospora delicata</i>	50 a
<i>Acaulospora mellea</i>	50 a
<i>Pacispora</i> sp.	250 b
Morfotipo 1 (naranja lisa)	50 a
Morfotipo 2 (café oscura rugosa)	50 a
Morfotipo 3 (amarillo cremosa)	50 a

Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05, Tukey).

Propagación en cultivos mono específicos de los HMA mediante sistema de minirizotrófon

Después de tres meses se encontró que de las 11 especies colocadas en sistema de minirizotrófon (Fase 1) únicamente se tuvo éxito en la colonización de la raíz de la planta hospedera y propagación de tres de ellas, que fueron *R. aff. intraradices*, *S. rubiformis* y *Glomus* sp.1, lo que corresponde al 27.2% del

total de especies seleccionadas (Tabla 4).

Sin embargo, al analizar el éxito en la propagación considerando la cantidad de réplicas por especie el porcentaje fue de 18.75 % para *S. rubiformis*, 10% para *Glomus* sp.1 y 7.7 % para *R. aff. intraradices*, lo que se asemeja a los valores reportados para otros métodos. Esto puede deberse que este trabajo probó la propagación de todas las especies de HMAs con una sola especie de planta (*Brachiaria decumbens*) en esta primer etapa con sistema de minirizotrófon.

Colonización micorrízica

Las tres especies que resultaron positivas en la Fase 1 (minirizotrófon) de propagación al analizar colonización en raíces se trasladaron para su propagación bajo condiciones de invernadero en maceta trampa utilizando como plantas hospederas *S. lycopersicum* y *B. decumbens*. Debido al bajo éxito en la propagación en cuanto a número de contenedores por especie propagada exitosamente en minirizotrófon (tres cajas de *S. rubiformis*, una de *Glomus* sp.1 y una de *R. aff. intraradices*) se decidió que en la propagación en maceta se

Tabla 4. Número de réplicas y eficiencia de colonización después de dos a tres meses en sistema de minirizotrófon

Fitobionte	Micobionte	Repeticiones	Porcentaje de éxito en la propagación en fase 2
<i>Brachiaria decumbens</i>	<i>Sclerocystis rubiformis</i>	16	18.75
	<i>Funneliformis geosporum</i>	13	
	<i>Glomus</i> sp.1	10	10
	<i>Glomus</i> sp.3	10	
	<i>Rhizophagus</i> aff. <i>intraradices</i>	13	7.7
	<i>Acaulospora delicata</i>	1	
	<i>Acaulospora mellea</i>	1	
	<i>Pacispora</i> sp.	5	
	Morfotipo 1 (naranja lisa)	1	
	Morfotipo 2 (café oscura rugosa)	1	
	Morfotipo 3 (amarillo cremosa)	1	

Tabla 5. Porcentajes de colonización obtenidos a 20 y 40 días de las especies propagadas en minirizotrófon

Especies	Porcentajes de colonización (%)	
	20 días	40 días
Inóculo puro	12 a	58.4 b
Consortio	75.3 b	95 b

Inóculo puro corresponde a la especie *Sclerocystis rubiformis*
 Consortio corresponde a las especies *Rhizophagus* aff. *intraradices* y *Glomus* sp. 1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tukey).

unieran *Glomus* sp.1 y *R.* aff. *intraradices* formando un consorcio y dejando como cultivo monoespecífico a *S. rubiformis*. Cumplidos dos meses de mantenimiento en este sistema se procedió a analizar porcentajes de colonización en base a observación de las estructuras típicas, abundancia de esporas y corroboración de la identidad de las esporas en los dos cultivos obtenidos.

Los resultados mostraron que el consorcio de *Glomus* sp. y *R.* aff. *intraradices* tuvo mayor éxito en la colonización logrando infectar a la planta con porcentajes de colonización del 75.3% a los 20 días y alcanzando el 95% al final del experimento a los 40 días, en comparación con el cultivo puro de *S. rubiformis* que mostró porcentajes

Tabla 6. Porcentajes de colonización obtenidos durante un curso temporal de las tiempos especies propagadas en macetas trampa

Especies	Porcentajes de colonización (%)			
	15 días	30 días	45 días	60 días
Inóculo puro	0 a	18 a	37 a	45 a
Consortio	52 b	67 b	94 b	99 b

Inóculo puro corresponde a la especie *Sclerocystis rubiformis*
 Consortio corresponde a las especies *Rhizophagus* aff. *intraradices* y *Glomus* sp. 1. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, Tukey).

inferiores al 12% a los 20 días y a los 40 días donde los porcentajes obtenidos fueron del 58.4% ($P \leq 0.05$ Tukey) (Tabla 5).

En la Fase 2, que correspondió a los cultivos en macetas trampa, el consorcio de *Glomus* sp. y *R.* aff. *intraradices*, se comportó igual que en el cultivo de minirizotrófon, ya que mostró mayores porcentajes en la colonización micorrízica, en comparación con el cultivo puro de *S. rubiformis* que mostró porcentajes inferiores, y con porcentajes bajos durante todo el curso temporal (Tabla 6).

Discusión

La diversidad de especies de HMA encontradas en el presente trabajo coincide con los valores reportados para suelos que presentan perturbación (González, 2005) y debido a que las cuatro zonas analizadas han sufrido cambios en el uso de suelo de bosque a huertas, se ha reducido la diversidad fúngica (González *et al.*, 2012).

Aun cuando un número de estudios han reportado que la colonización de algunos HMAs, así como el desarrollo del micelio fúngico, pueden ser estimulados con diferentes sustratos orgánicos (Gryndler *et al.*, 2005, 2006), en los resultados de nuestro estudio en cuanto a la riqueza total de especies de HMAs entre huertas, no se observaron diferencias ya que ésta fue semejante en ambas huertas (14 especies para la huerta Huitzichio y 13 para la huerta El Puerto) y no se presentaron diferencias significativas entre los promedios de especies entre los huertos de los predios Huitzichio y El Puerto. La riqueza encontrada en las cuatro zonas es baja si se considera que trabajos previos señalan que la variedad de especies presentes en suelos en buenas condiciones o en ecosistemas naturales poco perturbados varía de 15 a 20 en promedio (Bárceñas *et al.*, 2007; González *et al.*, 2005). Las prácticas de manejo del cultivo afectan la presencia de los HMAs, debido a la destrucción de las hifas, no obstante los efectos de la alteración del suelo sobre el establecimiento del hongo en las raíces de las plantas parece depender más de la especificidad de la asociación planta-hongo (Sanders *et al.* 1998). Esto pudo influir en nuestro estudio al encontrar pocas diferencias de diversidad de HMAs entre las huertas, ya que es común en todas las huertas de Michoacán, el cultivo de plantas de aguacate var 'Hass', por lo que puede haberse desarrollado una especificidad de ambos simbioses.

Los resultados obtenidos en este trabajo, además corroboran lo mencionado por otros trabajos (Jansa *et al.*,

2003; Oehl *et al.*, 2004), referente a que el género *Glomus* es el más abundante y con mayor número de especies en los ecosistemas (Varela y Trejo 2001) ya que en el presente estudio se aislaron tres especies pertenecientes a la familia Glomeraceae: *Rhizophagus* aff. *intraradices*, *Funneliformis geosporus* y *Sclerocystis rubiformis*, especies anteriormente pertenecientes al género *Glomus*. Además los tres morfotipos no identificados presentan características morfológicas que los hacen afines a este mismo grupo taxonómico. Esto también concuerda con los estudios realizados por Toljaldier *et al.* (2008), en un estudio de comunidades microbianas asociadas a la rizósfera del maíz, con prolongados periodos de fertilización, donde encontraron ocho secuencias de genes pertenecientes al género *Glomus* agrupadas en dos familias, pero tampoco encontraron diferencias de diversidad entre los sitios con manejo orgánico y el convencional.

Es necesario hacer notar que las huertas de aguacate, presentan una edad considerable, por lo que ya se consideran como un monocultivo y por tanto, al omitirse la rotación de cultivos, puede inducirse la reducción de la diversidad de HMAs, permitiendo la sobre dominancia de la familia Glomeraceae (Sasvári *et al.*, 2011).

Rhizophagus aff. *intraradices* y *Sclerocystis rubiformis* son especies que han sido reportadas asociadas a plantas de aguacate con mayor abundancia que otras especies, junto con *Acaulospora laevis*, y consideradas como especies dominantes (González, 2005; Gómez, 2009; Vega, 2010). Esto puede indicar que estas especies son aptas para sobrevivir y formar esporas bajo diversas condiciones cuando se asocian a este cultivo. Por lo tanto, estas especies pueden considerarse como generalistas para ecosistemas de cultivos de aguacate (Castillo *et al.*, 2006, 2010). Esto es un punto importante a considerar si se pretende elaborar inoculantes con especies nativas para ser utilizadas en huertas de aguacate.

Las especies *Glomus* sp.1 y *R. aff. intraradices* propagadas en consorcio resultaron altamente infectivas con porcentajes de colonización cercanos al 100% y *S. rubiformis* también mostró ser infectiva con valores de colonización cercanos al 60% aunque requirió de un mayor tiempo para el establecimiento de la colonización. Esto pudo deberse a que *R. aff. intraradices* se considera una especie altamente infectiva y adaptada a suelos agrícolas (Barrer, 2009), además algunos hongos pueden colonizar de manera más efectiva y beneficiar en mayor grado a un hospedero además de adaptarse mejor a las condiciones edáficas (Castillo *et al.*, 2008). Otras investigaciones mencionan que cultivos mixtos de *Claroideglomus claroideum* y *R. aff. intraradices*, promueven una mayor absorción de fósforo por la planta que cuando se propaga cada especie por separado (Jansa *et al.*, 2008) como fue el caso de *S. rubiformis*, que a pesar de ser una especie abundante y común en todos los lugares donde se siembra el aguacate, pudo verse afectada por carecer de la microbiota asociada, que actúa sinérgicamente para el desarrollo de la asociación (Franco *et al.*, 2008), además de otros factores como el tipo de suelo y el manejo agrícola. Por lo que se sugiere realizar no solamente pruebas de infectividad sino además pruebas de efectividad, tanto de manera aislada como en consorcio utilizando como planta hospedera el aguacate y otras plantas hospederas, antes de sugerirlo como inóculo (Carreón-Abud, datos no publicados).

Es importante mencionar que a partir de análisis moleculares (Gómez, 2009), se ha demostrado que especies como *Funneliformis geosporus* se han encontrado asociadas a las células corticales de la raíz de las plantas de aguacate. Sin embargo, esta especie no logró propagarse en el presente experimento, por lo que se recomienda para lograr el cultivo de esta especie y de una mayor diversidad de HMAs utilizar otro tipo de plantas hospederas bajo el sistema de minirizotrófon, ya que en el presente trabajo se reportó su presencia en los cuatro sitios de muestreo y por lo tanto

también podría ser una especie con potencial para ser utilizado como inóculo en el cultivo de aguacate.

La propagación en contenedores de mayor tamaño que las cajas bajo el sistema de minirizotrófon y la utilización de hospederas con sistemas de raíz más desarrollados permite la obtención de una mayor cantidad de inóculo. Por lo tanto el sistema de minirizotrófon utilizado resultó ser efectivo para la propagación de cultivos monoespecíficos *in vivo*, ya que los porcentajes de éxito en la propagación fueron mayores y además se controlaron agentes de contaminación externos, lo cual suele ser difícil de lograr dado que los HMAs son un grupo de microorganismos del suelo, que no pueden cultivarse en medios sintéticos en ausencia de la planta hospedera.

Conclusiones

El método de minirizotrófon, puede ser una herramienta útil para propagar HMAs en condiciones axénicas *in vivo* y resguardar colecciones de germoplasma. Una vez obtenidos los cultivos puros por medio de esta técnica, deben de llevar un seguimiento de evaluación de control de calidad, con diferentes sistemas almacenamiento, viabilidad de esporas y tiempo de vida de anaquel, además de realizar periódicamente pruebas de infectividad y efectividad con diferentes plantas hospederas. De esta manera, se pueden establecer como colecciones tipo, para conservar las propiedades esenciales de los HMAs y para poder ser explotados como bioinoculantes, o con la finalidad de conservación de ecosistemas, o para elevar la productividad de agroecosistemas, además ser una fuente de recurso genético potencial para la investigación básica de este importante grupo de hongos del suelo.

Agradecimientos

Se agradece al apoyo brindado por el SUBNARGEM-SAGARPA-COLPOS, al proyecto PROMEP-SEP Red de inoculantes micorrízicos y al proyecto FOMIX Michoacán 2009-115994 por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Literatura citada

- AMF PHYLOGENY. (<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>). Consultada el 12/06/2012.
- Bárceñas, A., C. Almaraz, L. Reyes, L. Varela, B. Lara, A. Guillén, Y. Carreón, A. Aguirre, A. Chávez, 2007. Diversidad de hongos micorrizógenicos arbusculares en huertos de aguacate de Michoacán. Proceedings VI World Avocado Congreso (Actas VI Congreso Mundial de Aguacate) Viña del Mar, Chile. 12 –16 de Nov.
- Barrer, S. E. 2009. El uso de Hongos Micorrízicos Arbusculares como alternativa para la agricultura. Facultad de Ciencias Agropecuarias 7: 124-132.
- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, N. Malajczuk, 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, ACIAR, Monograph 32.
- Cameron, D.D., 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi as (agro) ecosystem engineers. *Plant and Soil* 333:1-5.
- Castillo, C.G., F. Borie, R. Godoy, R. Rubio, E. Sieverding, 2006. Diversity of mycorrhizal plant species and arbuscular mycorrhizal fungi in evergreen forest, deciduous forest and grassland ecosystems of Southern Chile. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 80:40-47.
- Castillo, C., I. Aztroza, F. Borie, R. Rubio, 2008. Efecto de cultivos hospederos y no hospederos sobre propágulos micorrízicos arbusculares. *R. C. Suelo Nutrición Vegetal* 8:37-54.
- Castillo, C., R. Rubio, F. Borie, E. Sieverding, 2010. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in horticultural production systems of Southern Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10: 407-413.
- Declerck, S., S. Seguin, Y. Dalpé, 2005. The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as tool for germplasm collections. In: Declerck, S., Strullu, G, Fortin, A. (eds). *In vitro* culture of mycorrhizas. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 17-30.
- Franco, A.F., D.A. Castañeda, C.F. Úsuga, F.A. Gómez, C.A. Lopera, 2008. Efecto de la micorrización y la fertilización en la acumulación de biomasa en plantas de banano (*Musa AAA* cv. Gran Enano) (Musaceae). *Revista Nacional Agricultura Medellín*. 61: 4269-4278.
- Gómez, D. N., 2009. Diversidad de los hongos micorrízicos arbusculares asociados a plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) en un agroecosistema del Estado de Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia. Michoacán.
- González, C.J., 2005. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares en un agroecosistema de aguacate (*Persea americana* Mill) comparado con un bosque natural. Tesis de Maestría en Ciencias en Conservación y Manejo de Recursos Naturales. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia. Michoacán.
- González, J.C., M. Vega, L. Varela, M. Martínez, Y. Carreón, Gavito M. E., 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) communities and land use change: the conversion of temperate forests to avocado plantations and maize fields in central Mexico. *Fungal Ecology* 5:16-23.
- Gryndler, M, H. Hrselova, R. Sudova, H. Gryndlerova, V. Merhautova, 2005. Hyphal growth and mycorrhizal formation by the arbuscular fungus *Glomus claroides* BEG 23 is stimulated by humic substances. *Mycorrhiza* 15:483-488.
- Gryndler, M., J. Larsen, H. Hrselova, V. Razzcova, H. Gryndlerova, J. Kubat, 2006. Organic and mineral fertilization respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza* 16:159-166.
- Hernández, W., E. Salas, 2009. La inoculación con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. *Agronomía Costarricense* 33:17-30.
- INVAM (International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Endomycorrhizal Fungi): www.invam.caf.wvu.edu.
- Jansa, J., A. Mozafar, G. Kuhn, T. Anken, R. Ruh, I. R. Sanders, E. Frossard, 2003. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Journal of Applied Ecology* 13: 1164-117.
- Jansa, J., S.F. Andrew, S.E. Sally, 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177:779-789.
- McGonigle, T.P., M.H. Miller, D.G. Evans, G.L. Fairchild, J.A. Swan, 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115:495-501.
- Mnx-aa-029-scfi-2001. Análisis de aguas - determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba.
- Nmx-aa-008-scfi-2011. Análisis de agua - determinación del pH -método de prueba.
- Nmx-aa-026-scfi-2001. Análisis de agua - determinación de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba.
- Oehl, F., E. Sieverding, P. Mäder, D. Dubois, K. Ineichen, T. Boller, A. Wiemken, 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138:574-583.
- Olivares- Saénz, E., 1994. Paquete de diseños experimentales. FAUNL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L.
- Ortega-Larrocea, M. P., V.J.A. Morales, S.R. García, 2008. Cultivos monospóricos de hongos micorrízicos arbusculares. En: Álvarez-Sánchez, J., A.A. Monroy (Comps.), Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y su implicación de la restauración., Facultad de Ciencias, UNAM. México. pp. 69-83.
- Phillips, J. M., D.S. Hayman, 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-161.
- Sanders, I.R., R.T. Koide, D.L. Shumway, 1998. Diversity and structure in natural communities: the role of mycorrhizal symbiosis. In: Varma A., B. Hock (Eds.) *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Second edition.
- Sasvari, Z., L. Hornok, K. Posta, 2011. The community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of maize grown in a 50-year monoculture. *Biology and Fertility of Soils* 47: 167-176.
- Schenck, N.C., Y. Pérez, 1990. Manual for the Identification of VA mycorrhizal fungi. 3a ed. Published by Synergistic Publications. 286 p.
- Smith S. E., D.J. Read, 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Third Edition. Elsevier Ltd., London, England.
- Sieverding, E., 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. *GTZ, Eschborn, Germany*. 371 p.

- Toljander, J.F., J.C. Santos-González, A. Tehler, R.D. Finlay, 2008. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microbiology and Ecology* 65: 323-338.
- Varela, L., D. Trejo, 2001. Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo. *Acta Zoológica Mexicana*. Número Especial 1: 39-51.
- Vega F.M., 2010. Diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares y potencial micorrízico de dos agroecosistemas y una zona natural del estado de Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Walker, C., M. Vestberg, 1994. A simple and inexpensive method for producing and maintaining closed pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agricultural Science in Finland* 3: 233-239.
- Walkey, A., I.A. Black, 1934. An examination of Degtjarreff method for determining soil organic matter and proposed modification of chromic acid titration method. *Soil Science* 37: 29-38.