

Influencia de hongos micorrícicos arbusculares en el crecimiento y desarrollo de *Capsicum annuum* L.*

Arbuscular mycorrhizal fungi influence on growth and development of *Capsicum annuum* L.

Rogelio Alonso-Contreras¹, Luis Isaac Aguilera-Gómez¹, Martín Rubí-Arriaga², Andrés González-Huerta², Víctor Olalde-Potugal³ e Irma Victoria Rivas-Manzano¹

¹Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF). Campus Universitario "El Cerillo". El Cerrillo Piedras Blancas, Municipio de Toluca, Estado de México, km 15.5 carretera Toluca-Ixtlahuaca, C.P. 50200. Tel. 2965556 Ext. 121. E-mail: luishalc@lycos.com; ivrivasm@uaemex.mx. ²Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF). Campus Universitario "El Cerillo". El Cerrillo Piedras Blancas, Municipio de Toluca, Estado de México, km 15.5 carretera Toluca-Ixtlahuaca, C.P. 50200. Tel. 7222965554 Ext 121. E-mail: mrubia@uaemex.mx; Ext. 148 gonzalesh@uaemex.mx. ³Cinvestav-IPN. Unidad Irapuato. Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Laboratorio de Bioquímica Ecológica. Unidad Irapuato km 9.6 Libramiento norte carretera Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato. Código Postal 36500. Tel. 4626239600 E-mail: v.olalde@yahoo.com.mx. Autor para correspondencia: aocr0616@yahoo.com.mx.

Resumen

Esta investigación se realizó para determinar la densidad, diversidad y dinámica de esporas de hongos micorrícicos arbusculares (HMA), en el suelo bajo y fuera de la copa del árbol de un huerto de manzano (*Malus domestica* Borkh.) del municipio de San Felipe del Progreso, Estado de México. Se realizó un ensayo en invernadero con *Capsicum annuum* L., para evaluar la influencia de los HMA en la absorción de fósforo (P); el ensayo se estableció en un diseño factorial 3x2 con ocho repeticiones, bajo un diseño experimental completamente al azar. Se evaluó altura de planta, diámetro del tallo, número de hojas, área foliar, peso seco de la parte aérea de la planta y peso seco de la raíz. Los resultados obtenidos en 100 g de suelo permitieron identificar 570 y 481 esporas de HMA bajo y fuera de la copa del árbol, respectivamente. También se encontró que el gremio de HMA en el huerto constó de: *Glomus coremioides*, *G. sinuosum*, *G. geosporum* y *Gigaspora* sp. Los resultados del ensayo establecido en invernadero indicaron que los HMA tuvieron un efecto positivo ($p > 0.05$) sobre diámetro del tallo, área foliar, peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz, cuando actuaron

Abstract

This research was conducted to determine the density, diversity and dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal spores (HMA) on the ground under and outside the canopy of an orchard of apple (*Malus domestica* Borkh.) of the municipality of San Felipe del Progreso, State of Mexico. A trial was conducted in a greenhouse with *Capsicum annuum* L., to evaluate the influence of AMF in the absorption of phosphorus (P) the trial was conducted in a 3x2 factorial design with eight replications, under a completely randomized design. We evaluated plant height, stem diameter, number of leaves, leaf area, dry weight of the aerial part of the plant and root dry weight. The results obtained in 100g of soil helped to identify 570 and 481 AMF spores down out of the tree, respectively. We also found that, the guild of HMA in the garden consisted of: *Glomus coremioides*, *G. Sinuosum*, *G. geosporum* and *Gigaspora* sp. The results of the test under greenhouse indicated that, the AMF had a positive effect ($p > 0.05$) on stem diameter, leaf area, dry weight of shoot and root dry weight, when acting simultaneously with 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P.

* Recibido: marzo de 2012
Aceptado: diciembre de 2012

simultáneamente con $22 \mu\text{g ml}^{-1}$ de P. En peso seco de raíz, el tratamiento micorriza- $22 \mu\text{g ml}^{-1}$ de P, así como la interacción micorriza-dosis de P influyeron de manera significativa.

Palabras clave: microbiología, simbiosis mutualista, micorrizas arbusculares.

Introducción

En la actualidad existe un marcado interés en el manejo de la rizósfera, así como en el análisis de los efectos positivos de ciertos microorganismos del suelo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. La simbiosis mutualista más importante de las raíces de las plantas con microorganismos del suelo es efectuada por algunos hongos de la clase *Zygomycetes* del orden *Glomales*, denominados hongos micorrícicos arbusculares (HMA), que colonizan el sistema radical (Davies, 2000), y coadyuvan en el crecimiento de muchos cultivos; este efecto benéfico se atribuye a la aparente afinidad que tienen estos micosimbiontes por el fósforo; la absorción de este nutriente incrementa el crecimiento en plantas micorrizadas (Smith y Read, 1997) al incrementar el área de absorción efectiva de las raíces por la formación de una red extensiva de hifas extraradical, estos hongos también incrementan la eficiencia de absorción de nutrientes y exploran sitios donde las raíces más finas jamás llegarían, creando así un íntimo puente entre las plantas y el suelo, más allá de la rizósfera (Aikio y Routsalainen, 2002; Bhromsiri y Bhromsiri, 2010). En la actualidad más del 95% de las familias de plantas terrestres forman micorrizas arbusculares en condiciones naturales; este hecho muestra el éxito de esta asociación ya que los HMA además de participar en el aporte nutrimental de las plantas, proporcionan a los vegetales defensa contra patógenos (Gardezi *et al.*, 2000).

La diversidad de los HMA y otros microorganismos es una parte fundamental en el funcionamiento de un ecosistema debido a que estos ayudan directamente al desarrollo de las plantas por su aporte nutrimental y mejoran las características del suelo. En este sentido, el huerto de manzano donde se desarrolló este trabajo tiene 98 árboles del cultivar Royal Gala de 25 años de edad; aun cuando no se ha aplicado fertilización u otros insumos, la tasa de producción por árbol se ha mantenido en 35 kg. Los objetivos principales de este estudio fueron 1) determinar la densidad, diversidad y dinámica de esporas de hongos micorrícicos arbusculares en el ciclo de un año en el suelo bajo la zona de influencia de la

In root dry weight, mycorrhizal treatment- $22 \mu\text{g ml}^{-1}$ of P and mycorrhizal interaction of P dose did significantly influenced.

Key words: microbiology, arbuscular mycorrhizae, mutualistic symbiosis.

Introduction

There is currently considerable interest in the management of the rhizosphere and the analysis of the positive effects of soil microorganisms on growth and development of plants. The largest mutual symbiosis roots of the plants with soil microorganisms is effected by some fungi from the *Glomales* order and the *Zygomycetes* class, known as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to colonize the root system (Davies, 2000) and, contribute to the growth of many crops; this beneficial effect is attributed to the apparent affinity with these mycobionts by phosphorus; the absorption of this nutrient increases mycorrhizal plant growth (Smith and Read, 1997).

By increasing the effective absorption area of the roots by the formation of an extensive network of extra-radical hyphae, these fungi also increase the efficiency of nutrient absorption and explore sites where the finest roots never arrive, thereby creating a bridge between plants intimate and soil beyond the rhizosphere (Aikio and Routsalainen, 2002; Bhromsiri and Bhromsiri, 2010). Currently over 95% of terrestrial plant families form arbuscular mycorrhizal of natural conditions, this fact shows the success of this partnership as well as participating AMF in nutrient intake of plants, vegetables provide defense against pathogens (Gardezi *et al.*, 2000).

The diversity of AMF and other microorganisms is an essential part in the functioning of an ecosystem because they help to direct the development of plants for their nutritional intake and improve the soil's characteristics. Because of this, the apple orchard where this work has 98 developed the cultivar Royal Gala trees 25 years old, although not applied fertilizer or other inputs, the production rate per tree has remained at 35 kg. The main objectives of this study were 1) to determine the density, diversity and dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal spores in the one-year cycle in the soil under the influence zone of the tree and out of this in the municipality of San Felipe del Progreso,

copa del árbol y fuera de esta en el Municipio de San Felipe del Progreso, Estado de México, y 2) evaluar la influencia de estos micosimbiontes (HMA) en la absorción de fósforo (P) bajo tres niveles de fertilización (0, 22 y 44 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en chile ancho (*Capsicum annuum* L.)

Materiales y métodos

En el presente trabajo se utilizaron muestras de suelo de un huerto de manzano localizado en la comunidad de San Pedro el Alto, municipio de San Felipe del Progreso, Estado de México; esta localidad se ubica a 19°43' de latitud norte y 99°57' de longitud oeste y tiene una altitud de 2760 m. Las temperaturas media anual corresponde a 12.01°C y la precipitación es de 915.32 mm anuales (Promedio de 15 años Estación Meteorológica Tepatitlán, CNA).

El cultivar de manzano (*Malus domestica* Borkh.) utilizado fue Royal Gala que es de origen neocelandés se caracteriza por tener en la piel estrías rojas y naranjas sobre un fondo amarillo verdoso, su forma es redondeada y su pulpa es blanca y crujiente, aromática y jugosa. La planta presenta raíz superficial y poco ramificada, copa globosa de dos a tres metros de altura, de tallo erecto con corteza lisa y cubierta de lenticelas; las hojas son ovales, acuminadas, aserradas. Las flores son hermafroditas, se desarrollan antes que las hojas y se encuentran en número de tres a seis unidades en corimbo.

Se realizaron cuatro muestreos de suelo, uno en de cada estación del año, con intervalos de 90 días, a partir del 13 de marzo de 2008; en cada muestreo, en la capa arable se obtuvieron diez muestras de 1 kg de suelo, a una profundidad de 20 cm; los puntos de muestreo consideraron diez árboles distanciados a cinco metros, ubicados en dos líneas; una bajo el área de influencia de la copa del árbol y la otra fuera de ésta. Las muestras se mezclaron para formar un compuesto por cada línea, se tomó 1 kg de suelo y de éste, tres submuestras de 100 g, se sometieron a tamizado en húmedo y flotación en glicerol al 50% para la obtención de esporas de HMA (Gerderman y Nicholson, 1963).

El sobrenadante de cada submuestra fue depositado en cajas petri para contabilizar y separar las esporas por color y morfología mediante un microscopio estereoscópico Leica a 100x, finalmente se montaron en un portaobjetos con lactoglicerol para la identificación de especies, que se llevó a cabo en un microscopio compuesto de campo claro a 40x.

State of Mexico, and 2) to evaluate the influence of these mycobionts (HMA) in the absorption of phosphorus (P) under three fertilization levels (0, 22 and $\mu\text{g ml}^{-1}$) in chile ancho (*Capsicum annuum* L.)

Materials and methods

In this paper we used soil samples from an orchard of apple trees located in the community of San Pedro el Alto, municipality of San Felipe del Progreso, Mexico, this town is located at 19° 43 'N latitude and 99° 57' west longitude and an elevation of 2760 m. The average annual temperature corresponds to 12.1 °C and precipitation is 915.32 mm per year (average 15 years Tepatitlán Weather Station, CONAGUA).

The cultivar of apple (*Malus domestica* Borkh.) was used is Gala Royal, from New Zealand origin, characterized by red streaks on the skin and orange on a yellow-green, its shape is rounded and its flesh is white and crisp, aromatic and juicy. The plant has shallow roots and few branches, globose tip from two to three meters tall, erect stem with smooth bark and lenticels cover, the leaves are oval, acuminate, serrated. The flowers are hermaphrodite, develop before the leaves and are in number from three to six units in corymb.

There were four soil samples, one for each season, at intervals of 90 days, from March 13th, 2008, in each sample, in the topsoil ten samples were obtained from 1 kg of soil, a depth of 20 cm, the sampling points considered ten trees spaced five meters, located in two lines, one under the influence area of the tree and the other outside of it. The samples were mixed to form a compound for each line, taking 1 kg of soil and from this; three subsamples of 100 g were subjected to wet sieving and flotation in 50% glycerol to obtain spores of HMA (Gerderman and Nicholson, 1963).

The supernatant of each subsample was placed in a petri dish for counting and separating the spores by color and morphology using a Leica stereomicroscope at 100 x, finally mounted on a slide for species identification, which is carried out in a composite bright field microscope at 40 x.

Inoculum multiplication

Bringing a lot of multiplication of spores with 30 containers with a capacity of 1 kg using as host plant *Sorghum vulgare*, which developed into a sand-soil mixture 1:1 v/v, pH 5.9,

Multiplicación del inóculo

Se montó un lote de multiplicación de esporas con 30 contenedores con capacidad de 1 kg utilizando como planta huésped *Sorghum vulgare*, el cual se desarrolló en una mezcla de arena-suelo 1:1 v/v, con Ph de 5.9, 2.1% de materia orgánica y 18.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P, que previamente fue esterilizada en autoclave a una presión de 120 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ por una hora durante tres días consecutivos. Las macetas fueron inoculadas con 100 g de suelo de la muestra compuesta original que contenía 250 a 300 esporas aproximadamente. El riego se llevó a cabo adicionando agua destilada en intervalos de tres días manteniendo las macetas a capacidad de campo; la fertilización se realizó semanalmente añadiendo a cada contenedor 125 ml de solución nutritiva Long Ashton (LANS) (Hewitt, 1966) modificada con 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fósforo.

Después de cuatro meses, se realizó un conteo de esporas por triplicado de tres contenedores tomados aleatoriamente del lote de multiplicación, para cerciorarse de que existieran más de 700 esporas por cada 100 g de suelo.

Incorporación de fósforo por los HMA

El sustrato utilizado como inóculo para el ensayo agronómico fue obtenido del lote de propagación de esporas. El ensayo fue establecido en un invernadero de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, utilizando *Capsicum annuum* (chile ancho) como macrosimbionte. El arreglo factorial consto de dosis de fertilización fosfatada (0, 22 y 44 $\mu\text{g ml}^{-1}$), inoculación (plantas inoculadas y sin inocular). Los seis tratamientos fueron evaluados en un diseño experimental completamente al azar, con ocho repeticiones. La unidad experimental fue una planta.

La semilla de *Capsicum annuum* fue desinfectada con Cloramina T al 5% por un período de tres minutos y enjuagada con agua esterilizada. Las plantas crecieron en contenedores de 1 kg de capacidad. En los tratamientos inoculados, los contenedores se llenaron a $\frac{3}{4}$ de capacidad con la misma mezcla de sustrato estéril v/v descrita en la multiplicación de inóculo y se agregó 100 g de inóculo esparcido en una capa sobre el sustrato, posteriormente se agregó otra capa de sustrato estéril, se colocaron cinco semillas y se cubrieron con sustrato. En los contenedores con los tratamientos no inoculados se sembraron cinco semillas desinfectadas cubiertas con sustrato estéril. Las semillas

2.1% of matter organic and 18.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P, which was previously autoclaved at a pressure of 120 kg cm^{-2} for one hour during three consecutive days. The pots were inoculated with 100 g of soil sample composed of the original spores containing approximately 250 to 300. Irrigation was carried out by adding distilled water at intervals of three days while maintaining the pots at field capacity, the fertilization was performed weekly by adding to each 125 ml container Long Ashton nutrient solution (LANS) (Hewitt, 1966) modified with 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of phosphorus.

After four months, in triplicate a spore count of three containers taken randomly from the batch of multiplication was conducted to ensure that there were over 700 spores per 100 g of soil.

Incorporation of phosphorus by HMA

The substrate used as inoculum for the assay was obtained from batch agronomic propagation of spores. The trial was established in a greenhouse at the Faculty of Agricultural Sciences at the Autonomous University of the State of Mexico, using *Capsicum annuum* (chile ancho) as macro-symbiont. The factorial arrangement consisted of phosphate fertilization rates (0, 22 and 44 mg ml^{-1}), inoculation (inoculated and uninoculated plants). The six treatments were evaluated in a completely randomized design with eight replications. The experimental unit was a plant.

Capsicum annuum seeds were disinfected with Chloramine T at 5% for a period of three minutes and rinsed with sterile water. The plants were grown in 1-kg capacity. In the inoculated treatments, containers are filled to $\frac{3}{4}$ of the same capacity with sterile substrate mixture v/v described in multiplying said inoculum and 100 g of inoculum spread in a layer on the substrate, then added another layer sterile substrate, five seeds were placed and covered with substrate. In containers with un-inoculated treatments planted five seeds covered with sterile substrate disinfected. The seeds germinated irrigation supply with distilled water containers kept at field capacity. At 12 days after germination, grew a plant for each container in all the treatments.

The plants were kept in the same conditions of humidity than in the batch inoculum propagation. At 17 days after germination and maturation occurred the first two leaves, fertilization began once a week, using 125 ml of Long Ashton nutrient solution (LANS), with the corresponding change in the dose of phosphate fertilization.

germinaron con suministro de riegos con agua destilada que mantuvo a los contenedores a capacidad de campo. A los 12 días de la germinación, se dejó crecer una planta por cada contenedor en todos los tratamientos.

Las plantas se mantuvieron en las mismas condiciones de humedad que en el lote de multiplicación del inóculo. A los 17 días de la germinación y al presentarse la maduración de las dos primeras hojas, se inició la fertilización una vez por semana, aplicando 125 ml de la solución nutritiva Long Ashton (LANS), con su respectiva modificación en la dosis de fertilización fosfatada.

El análisis agronómico concluyó a los 98 días de la emergencia de la planta, cuando aparecieron los primeros frutos. Se realizó la evaluación de la altura de planta, el diámetro de tallo, el número de hojas, el área foliar total, el peso seco de la parte aérea de la planta, el peso seco de la raíz, la colonización micorrícica en raíces de *C. annuum* mediante el método descrito por Phillips y Hayman (1970) y fotosíntesis.

La tasa fotosintética estimada se registró en $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}$ con el sistema portátil (SPF), analizador de gases por infrarrojo Li-6400 (LiCor Inc., Lincoln, Nebraska, USA); se tomaron aleatoriamente seis plantas por tratamiento, de cada planta fueron tomadas dos hojas, una de la parte basal y otra de la parte media. La medición se llevó a cabo en días despejados cuando el flujo fotónico varió entre 332 y 335 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}$ medidos con un fluxómetro marca EXTECH Instruments, modelo 401025. La medición se efectuó a los 52, 83 y 95 días de la emergencia de la planta.

Los resultados de densidad, diversidad y dinámica de esporas de HMA fueron analizados con estadística no paramétrica; la prueba de "U" de Mann Whitney se aplicó a la densidad de esporas, el análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis para la densidad de esporas entre sitios de muestreo y estación climática y el índice de diversidad de Simpson.

Los resultados del ensayo en invernadero se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), con el apoyo del paquete estadístico SAS. Para las variables con diferencias entre tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

The agronomic analysis concluded at 98 days of plant emergence when the first fruits appeared. We performed the evaluation of plant height, stem diameter, number of leaves, total leaf area, dry weight of the aerial part of the plant, root dry weight, mycorrhizal colonization in roots of *C. annuum* by the method described by Hayman and Phillips (1970) and photosynthesis.

The estimated photosynthetic rate was recorded in $\mu\text{mol m}^{-2}$ with the portable system (SPF), infrared gas analyzer Li-6400 (LiCor Inc., Lincoln, Nebraska, USA) were randomly six plants per treatment, each plant were taken two leaves, one at the heel and over the middle. The measurement was conducted on a clear day when the photon flux ranged between 332 and 335 $\mu\text{mol m}^{-2}$ measured with a flow meter Extech Instruments brand, model 401025. The measurement was performed at 52, 83 and 95 days after the emergence of the plant.

The results of density, diversity and dynamics of AMF spores were analyzed with nonparametric statistics, the conviction "U" of Mann Whitney was applied to the density of spores, analysis of variance ranking method of Kruskal-Wallis spore density between sampling sites and weather station and the Simpson diversity index.

The results of the greenhouse trial were subjected to the analysis of variance (ANOVA), with the support of the SAS statistical package. For variables with differences between treatments applied the Tukey test ($\alpha = 0.05$).

Results

Nonparametric variables

Spore density

In this variable, there were significant differences ($p < 0.05$) between low and outside the area of influence of the tree canopy and highly significant ($p < 0.001$) for the spring and fall seasons, respectively. Moreover, in the analysis of variance of a ranking of Kruskal-Wallis we used for the total values of the density of spores, significant differences ($p < 0.05$) between seasons within sites sampling and in the autumn season there as AMF spore density outside and under the canopy.

Resultados

Variables no paramétricas

Densidad de esporas

En esta variable se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre bajo y fuera del área de influencia de la copa del árbol y diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) para las estaciones primavera y otoño, respectivamente. Por otra parte, en el análisis de varianza de clasificación por rangos de Kruskal-Wallis, para el que se utilizaron los valores totales de la densidad de esporas se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las estaciones del año dentro de los sitios de muestreo y en la estación de otoño existió la mayor densidad de esporas de HMA fuera y bajo la copa de los árboles.

Diversidad de especies

Se identificaron cuatro especies de hongos micorrícicos arbusculares: *Glomus geosporum*, *G. coremioides*, *G. sinuosum* y *Gigaspora* sp. La riqueza de especies en el suelo, fuera y bajo la copa de los árboles fue idéntica en todas las estaciones del año (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diversidad de especies encontradas en el huerto de manzano.

Table 1. Species diversity found in the apple orchard.

	<i>S</i>	χ	<i>d</i>	<i>e</i>
Bajo la copa del árbol				
Primavera	4	0.66	1.51	0.37
Verano	4	0.65	1.54	0.381
Otoño	4	0.45	2.22	0.55
Invierno	4	0.68	1.47	0.36
Fuera de la capa del árbol	4			
Primavera	4	0.5	2	0.48
Verano	4	0.53	1.88	0.49
Otoño	4	0.44	2.27	0.47
Invierno	4	0.51	1.96	0.56

Índice de diversidad de Simpson. *S*= riqueza de especies, χ = diversidad de especies, *d*= densidad de especies, *e*= equidad.

Dinámica poblacional de esporas de HMA

La densidad de esporas de hongos micorrícicos tiende a disminuir en el verano y fue mayor en el suelo muestreado fuera de la copa de los árboles. Dentro y fuera de la copa de los árboles las densidades más bajas se presentaron en julio, agosto y septiembre; la densidad de esporas tiende a incrementarse

Species diversity

We identified four species of arbuscular mycorrhizal fungi: *Glomus geosporum*, *G. coremioides*, *G. sinuosum* and *Gigaspora* sp. Species richness in soil, outside and under the canopy identical in all the seasons (Table 1).

Population dynamics of AMF spores

The density of spores of mycorrhizal fungi tends to decrease in the summer and was higher in the soil sampled outside the canopy. In and out of the treetops of the lowest densities occurred in July, August and September; spore density tends to increase in the fall season for both conditions because the dominance decreases and increases equity between populations spores, though to a lesser extent outside the canopy of the apple tree.

Parametric variables

HMA Influence on the incorporation of phosphorus

The growth of chile ancho plants during the first 12 days after germination was not significantly different between the control plants and the plants inoculated with AMF.

However, as the growing season progressed there were differences between them. The plant height and number of leaves, analysis of variance indicated no significant differences ($p > 0.05$) in both study factors (Table 2). For the stem diameter, there were significant differences ($p < 0.05$) between the treatments inoculated and the control's treatments; treatment with 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P and with

en la estación de otoño para ambas condiciones debido a que disminuye la dominancia y aumenta la equidad entre las poblaciones de esporas, aunque en menor proporción fuera de las copas de los árboles de manzano.

Variabes paramétricas

Influencia de los HMA en la incorporación de fósforo

El crecimiento de las plantas de chile ancho durante los primeros 12 días, después de la germinación no presentó diferencias significativas entre las plantas testigo y las plantas inoculadas con HMA. Sin embargo, a medida que avanzó el desarrollo del cultivo se presentaron diferencias entre ambos factores. En la altura de planta y en el número de hojas, el análisis de varianza indicó que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en ambos factores de estudio (Cuadro 2). Para diámetro de tallo existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos inoculados y los tratamientos testigo; el tratamiento con $22 \mu\text{g ml}^{-1}$ de Py con la intervención de los micosimbiontes (T_21), mostró un mayor efecto para esta variable pero no se encontró efecto alguno en la interacción AxB.

Para la variable colonización micorrícica (%), los datos fueron transformados a $\text{arc sen } \sqrt{\%}$.

the intervention of mycobionts (T_21), showed a greater effect for this variable but found no effect on the interaction AxB.

For the variable mycorrhizal colonization (%), data were transformed to $\text{arc sen } \sqrt{\%}$.

Where:

T1, 0= $0 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phosphorus, without mycorrhizae;
 T2, 0= $22 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phosphorus without mycorrhizae;
 T3, 0= $44 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phosphorus without mycorrhizae;
 T1, 1= $0 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phosphorus, with mycorrhizae;
 T2, 1= $22 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phosphorus with mycorrhizae;
 T3, 1= $44 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phosphorus by mycorrhizal fungi.

The results obtained in the analysis of variance for root dry weight showed significant differences ($p < 0.001$) between inoculated and un-inoculated treatments, explained by the fact that there is a close relationship between the presence of arbuscular mycorrhizal fungi and the development of the plant root structure, and that the inoculated plants showed the highest levels in this variable compared to plants which were not inoculated. In this sense, the greatest expression of the association expressed with $22 \mu\text{g ml}^{-1}$ of P (T_21) (Figure 1).

Cuadro 2. Análisis de varianza de las variables evaluadas en *Capsicum annuum* sometida a tres dosis de fertilización e inoculación micorrízica arbuscular.

Table 2. Analysis of variance of the variables evaluated in *Capsicum annuum* subjected to three doses of fertilization and arbuscular mycorrhizal inoculation.

Variabes	G.L	Cuadrados medios	ds	F Calculada	PR>F $\alpha=0.05$
Altura de planta (cm)					
Dosis de fósforo (A)	2	60.89	2.26	1.62	0.2109 ^{NS}
Micorrizas (B)	1	64.58	2.28	1.88	0.1778 ^{NS}
Micorrizas-fósforo	2			0.6	0.5530 ^{NS}
Diámetro de tallo (mm)					
Dosis de fósforo	2	6.687	0.38	2.53	0.0921 ^{NS}
Micorrizas	1	7.159	0.177	4.24	0.0458*
Micorrizas-fósforo	2			1.57	0.2195 ^{NS}
Número de hojas					
Dosis de fósforo	2	53	3.17	1.16	0.32 ^{NS}
Micorrizas	1	61	2.88	4.68	0.03 ^{NS}
Micorrizas-fósforo	2			0.8	0.45 ^{NS}
Peso seco de la parte aérea (g)					
Dosis de fósforo	2	9.21	2.69	10.92	0.0002**
Micorrizas	1	11.52	0.56	13.06	0.0008**
Micorrizas-fósforo	2			2.82	0.0712 ^{NS}
Peso seco de la raíz (g)					
Dosis de fósforo	2	3.02	0.413	12.09	0.0002**
Micorrizas	1	5.26	0.241	19.47	0.0002**
Micorrizas-fósforo	2			6.95	0.004**

Cuadro 2. Análisis de varianza de las variables evaluadas en *Capsicum annuum* sometida a tres dosis de fertilización e inoculación micorrízica arbuscular (Continuación).

Table 2. Analysis of variance of the variables evaluated in *Capsicum annuum* subjected to three doses of fertilization and arbuscular mycorrhizal inoculation (Continuation).

Variabes	G.L	Cuadrados medios	ds	F Calculada	PR>F $\alpha=0.05$
Área foliar (cm ²)					
Dosis de fósforo	2	836.476	32.82	9.64	0.0008 **
Micorrizas	1	1086.948	2.94	11.1	0.002 **
Micorrizas-fósforo	2			0.24	0.7898 ^{NS}
Tasa fotosintética					
Dosis de fósforo	2	8.017	0.61	58.505	0.00056**
Micorrizas	1	12.96	1.07	92.58	0.00045**
Micorrizas-fósforo	2			30.7	0.0018**
Porcentaje de colonización					
Dosis de fósforo	2	1.074	0.173	29.6	0.13 ^{NS}
Micorrizas	1	67.17	0.73	1020.8	0.000046**
Micorrizas-fósforo	2			18.7	0.002**

Donde:

- T1.0= 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fósforo, sin micorrizas.
 T2.0= 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fósforo sin micorrizas.
 T3.0= 44 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fósforo sin micorrizas
 T1.1= 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fósforo, con micorrizas.
 T2.1= 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fósforo con micorrizas.
 T3.1= 44 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fósforo con micorrizas.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza para peso seco de la raíz; mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre tratamientos inoculados y no inoculados, explicables por el hecho de que existe una estrecha relación entre la presencia de hongos micorrícicos arbusculares y el desarrollo de la estructura radical de la planta, ya que las plantas inoculadas presentaron los niveles más altos en esta variable respecto a las plantas que no fueron inoculadas. En este sentido, la mayor expresión de la asociación se manifestó con 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P (T₂1) (Figura 1).

En peso seco de la parte aérea y en área foliar también existieron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) en los tratamientos inoculados con HMA respecto a los tratamientos testigo; la mayor área foliar y la mayor producción de biomasa se presentaron en el tratamiento con inoculación de hongos micorrícicos arbusculares y con 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fertilización de P, pero la interacción entre ambos factores no fue significativa en ambas variables (Figura 2). En la tasa fotosintética existieron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre tratamientos inoculados y no

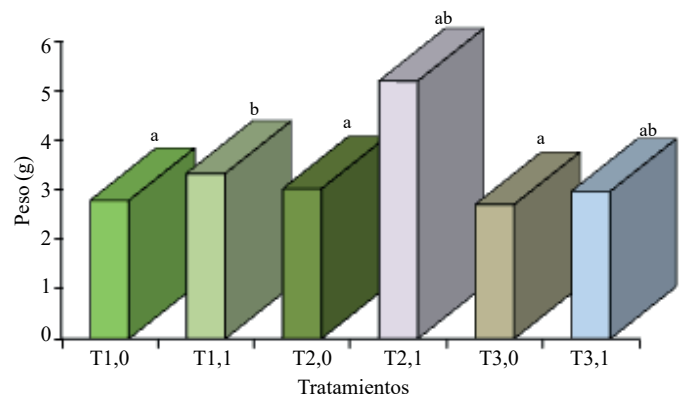


Figura 1. Efecto de los HMA en la absorción y asimilación de P en Peso seco de la raíz.

Figure 1. AMF effect on the absorption and assimilation of P in root dry weight.

Dry weight of shoot and leaf area differences were also highly significant ($p < 0.001$) in the treatments inoculated with AMF compared to the control treatments, the greater leaf area and higher biomass production occurred in the inoculation treatment of the arbuscular mycorrhizal fungi and with 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P fertilization, but the interaction between the factors was not significant in both variables (Figure 2). In the photosynthetic rate differences were highly significant ($p < 0.01$) between inoculated and un-inoculated treatments with AMF (Table 2). The results showed that, treatments with 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P and inoculations (T₂1) were highly significant compared to the other treatments. The treatment with 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P and AMF (T₁1) was not significant ($p > 0.05$) with 44 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P and inoculation (T₃1).

inoculados con HMA (Cuadro 2). Los resultados muestran que los tratamientos con 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P y con inoculación (T_{21}), fueron altamente significativos respecto a los demás tratamientos. El tratamiento con 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P y con HMA (T_{11}) no fue significativo ($p > 0.05$) con el de 44 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P y con inoculación (T_{31}).

Al aplicar la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) se encontró que la mayor colonización de las raíces por los HMA ocurrió en el tratamiento de 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P y con inoculación (T_{21}) con un 58%, sin embargo éste no fue estadísticamente diferente ($p > 0.05$) del tratamiento con 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P y con HMA (T_{11}) (78%). Entre los tratamientos T_{21} y T_{31} también existieron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$), así como en la interacción HMA-fósforo. La colonización del hongo en las raíces de los tratamientos no inoculados fue insignificante, ya que solamente presentaron el 2.21% en el tratamiento con 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P sin HMA, mientras que en los demás tratamientos sin HMA (22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P (T_{20}) y 44 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P (T_{30}) no existió colonización.

Discusión

Densidad de esporas y diversidad de especies

El número de esporas y de especies son dos importantes componentes para la sustentabilidad de los ecosistemas, incluyendo los agroecosistemas. La riqueza de especies de hongos micorrícicos arbusculares encontrada en la huerta evaluada en este estudio se puede considerar baja comparada con los resultados obtenidos por Carrenho *et al.* (2001), sin embargo, se encontraron especies como *Glomus coremioides* y *Glomus sinuosum* que de acuerdo con otras investigaciones, tienen la característica de formar simbiosis mutualista con plantas de hábito perenne, los cuales pudieron contribuir a la productividad de los árboles de manzano durante el tiempo de vida sin ningún manejo técnico.

Dinámica poblacional de esporas

La dinámica poblacional de esporas de HMA en el huerto de manzano fue oscilante lo que conduce a pensar que el decremento en la densidad de esporas del gremio se debe probablemente, a que las condiciones climáticas en la temporada de lluvias son favorables para que estos micosimbiontes presenten la mayor actividad de germinación y la consecuente colonización de los sistemas radicales de las plantas.

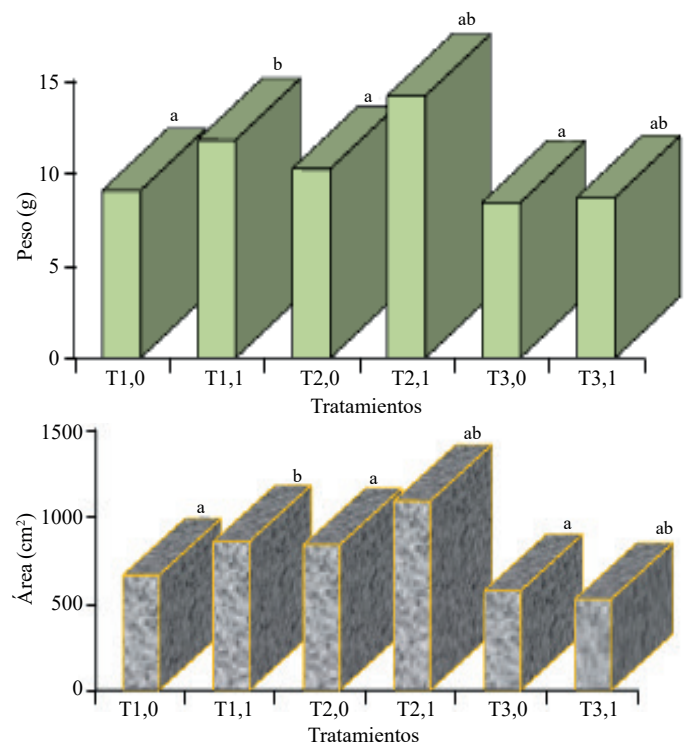


Figura 2. Efecto de los HMA en la absorción de P en relación a: (a) peso seco de parte aérea (b) área foliar en *Capsicum annuum*.

Figure 2. AMF effect on P uptake in relation to: (a) dry weight of aerial part (b) leaf area in *Capsicum annuum*.

By applying the Tukey test ($\alpha = 0.05$) it was found that most of the root colonization by AMF occurred in the treatment of 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P and inoculation (T_{21}) with 58%; however, this was not statistically different ($p > 0.05$) in respect to the treatment with 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P and HMA (T_{11}) (78%). Between the treatments T_{21} and T_{31} there were also significant differences ($p < 0.01$) as well as in the AMF-phosphorus interaction. The colonization of the fungus in the roots of un-inoculated treatments was not significant, considering they only showed 2.21% in the treatment with 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P without HMA, while in the other treatments without AMF (22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P (T_{20}) and 44 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P (T_{30}) there was no settlement.

Discussion

Spore density and species diversity

The number of spores and species are two important components for the sustainability of ecosystems, including agro-ecosystems. Species richness of arbuscular

En la estación de otoño se presentó la mayor cantidad de esporas de HMA, ya que de acuerdo con el diagrama ombrotérmico, en esta época inician condiciones climáticas críticas que activan el mecanismo de supervivencia de los micosimbiontes y esto ocasiona una mayor formación de esporas.

Ensayo agronómico para evaluación de los HMA

El lento crecimiento de las plantas en los primeros días posteriores a la germinación empezó a incrementarse a las tres semanas, este comportamiento similar también fue observado en estudios de micropropagación de chile ancho con asociaciones micorrícicas (Estrada Luna y Davies, 2003) y debido a estos resultados los autores concluyeron que este efecto es consecuencia de la baja colonización que existe en etapas tempranas, lo cual puede atribuirse al crecimiento lento de las plantas de *C. annuum*.

En altura de planta no existieron diferencias significativas entre los tratamientos lo que coincide con lo reportado por Davies y Linderman (1991). Sin embargo, Davies (2005) evaluó la influencia de HMA endémicos en el crecimiento, rendimiento y concentración nutrimental en las hojas de *Solanum tuberosum* L. cv "Yungay"; y encontró que micosimbiontes mostraron efectos positivos en el crecimiento del cultivo, rendimiento de tubérculo y una mayor eficiencia en la absorción de P, Fe y Mg.

Los hongos micorrícicos arbusculares del presente ensayo promovieron una mayor eficiencia en la absorción nutrimental de las plantas de *C. annuum*, lo que pudo originar un mejor desarrollo en el diámetro del tallo de las plantas inoculadas respecto a las testigo. Estas evidencias mostraron que la mayor expresión de los micosimbiontes en diámetro de tallo se encontró cuando actuaron simultáneamente con las dosis altas de fertilización fosfatada.

En el número de hojas, las micorizas arbusculares no tuvieron efectos significativos sobre los tratamientos testigo. Sin embargo, existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) que mostraron que las plantas inoculadas tuvieron una mayor expansión foliar y una mayor producción de biomasa aérea que las plantas que no fueron inoculadas, y que el mayor efecto de los micosimbiontes se observó cuando actuaron con dosis de fertilización fosfatada de $22 \mu\text{g ml}^{-1}$. Estos resultados coinciden con otras investigaciones (Amaya *et al.*, 2005; Díaz-Franco y Garza-Cano, 2006, 2007; Guissou, 2009; Rubí *et al.*, 2009, 2012) lo que permite manifestar que los hongos micorrícicos arbusculares incrementan la eficiencia de absorción de P y

mycorrhizal fungi found in the orchard evaluated in this study can be considered low compared with the results obtained by Carrenho *g.* (2001); however, the found species such as *Glomus sinuosum* and *Glomus coremioides* that according to other research have the property of forming mutualistic symbiosis with plants of perennial habit, which could contribute to the productivity of apple trees during no lifetime technical management.

Population dynamics of spores

The population dynamics of AMF spores in apple orchard was oscillating leading to think that, the decrease in the density of spores is probably due to the weather conditions in the rainy season, favorable for these mycobionts with increased activity of germination and subsequent colonization of the root systems.

During the autumn season is presented as many AMF spores, since according to the ombrothermal diagram, this time initiated critical weather conditions that activate the survival mechanism of mycobionts and this causes an increased spore formation.

Agronomic trial for HMA evaluation

The slow growth of the plants in the first days after germination began to increase at three weeks, this similar behavior was also observed in micro-propagation studies with mycorrhizal associations of chile ancho (Estrada Luna and Davies, 2003) and because of these results the authors concluded that, this effect is due to the low colonization there early, which may be attributed to the slow growth of *C. annuum*.

In plant height, where were no significant differences between the treatments, which are consistent with that reported by Davies and Linderman (1991). However, Davies (2005) evaluated the influence of endemic HMA in growth, yield and nutrient concentration in the leaves of *Solanum tuberosum* L. cv "Yungay" and found that mycobionts showed positive effects on the crop's growth, tuber yield and greater efficiency in the absorption of P, Fe and Mg.

The arbuscular mycorrhizal fungi of this paper promoted more efficient nutrient uptake of plants of *C. annuum*, which could lead to a better development in stem diameter of inoculated plants compared to the control. This evidence

su subsecuente traslocación a los tejidos vegetales, a lo se le puede atribuir una mayor expansión foliar, además de que estos micosimbiontes incrementan su actividad cuando actúan de manera simultánea con dosis media de fertilización fosfatada.

En el peso seco de la raíz se encontró que los HMA tuvieron un efecto en la estructura de la raíz, lo cual originó que las plantas inoculadas tuvieran una arquitectura radical de mayores proporciones, que la observada en los tratamientos testigo. Esto indica que el fósforo influye de manera directa en los cambios de la arquitectura radical (López-Bucio *et al.*, 2002), mostrando así un crecimiento continuo de la raíz primaria con un incremento de división y elongación celular.

La inoculación con HMA endémicos en combinación con 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P dio lugar a una respuesta diferencial positiva en la fotosíntesis y en porcentaje de colonización, lo cual concuerda con Davies (2000); Amaya *et al.* (2005); Díaz-Franco y Garza-Cano (2007), Rubí *et al.* (2009, 2012), que particularmente destacó en un incremento en la actividad fotosintética en los tratamientos inoculados respecto a las plantas no inoculadas.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, en el presente estudio se puede concluir que; el número de esporas de hongos micorrícicos que se encontró en la huerta es elevado; también se puede mencionar que estas esporas tienen su mayor actividad de germinación y colonización en la estación de verano.

La presencia de HMA como *G. coremioides* y *G. sinuosum* en el huerto de manzano pueden ser los responsables de la supervivencia y tasa de producción actual de los árboles de manzano.

La combinación HMA con 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de P se establece como una alternativa promisoriosa para la producción hortícola.

Literatura citada

Aikio, S. and Ruotsalainen, A. 2002. The modeled growth of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants under constant versus variable soil nutrient concentration. *Mycorrhiza* 12:257-261.

showed that, the increased expression of mycobionts in stem diameter was found when acted simultaneously with high doses of fertilization.

In the number of leaves, mycorrhizae had no significant effect on the control treatments. However, significant differences ($p > 0.05$) showed that, the inoculated plants had higher leaf expansion and increased biomass production of the plants that were not inoculated, and that the greatest effect was observed when the mycobionts acted in phosphate fertilizer dose of 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$. These results are consistent with other research (Amaya *et al.*, 2005; Díaz-Franco and Garza-Cano, 2006, 2007; Guissou, 2009; Rubí *et al.*, 2009, 2012) showed that allowing arbuscular mycorrhizal fungi increase P uptake efficiency and subsequent translocation to the plant's tissues, which can be attributed to a greater leaf expansion, besides these mycobionts increase their activity when acting simultaneously with mean dose of fertilization.

In the root dry weight it was found that AMF had an effect on the structure of the roots, which originated that the inoculated plants had a radical architecture of major proportions, than that observed in the control treatments. This indicated that, the phosphorus directly influences changes in the radical architecture (López-Bucio *et al.*, 2002), thus showing a continuous growth of the primary root with increased cell division and elongation.

Inoculation with endemic AMF in combination with 22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of P resulted in a positive differential response of photosynthesis and colonization percentage, which agrees with Davies (2000); Amaya *et al.* (2005); Díaz-Franco and Garza-Cano (2007); Rubí *et al.* (2009, 2012), which particularly highlighted in increased photosynthetic activity in the inoculated treatments compared to uninoculated plants.

Conclusions

According to the results obtained in the present study, it can be concluded that: the number of spores of mycorrhizal fungi which are found in the orchard is high; it can also be noted that these spores have their highest germination activity and colonization in the summer.

- Amaya, L.; Davies, F. T. and Arnold, M. A. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi, organic and inorganic controlled-release fertilizers: effect on growth and leachate of container-grown bush morning glory (*Ipomoea carnea* ssp. *fistulosa*) under high production temperatures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130(1):131-139.
- Bhromsiri, C. and Bhromsiri, A. 2010. The effects of plant grown-promoting Rhizobacteria and Arbuscular Fungi on the growth, development and nutrient uptake of different vetiver ecotypes. *Thail Journal of Agricultural Science* 43(4):239-249.
- Carrenho, R.; Eraldo-Schunk, S.; Trufem, S. F. B. and Bononi, V. L. R. 2001. Successive cultivation of maize and agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 32(4):262-270.
- Davies, F. T. and Linderman R. G. 1991. Short term effects of phosphorus and VA-mycorrhizal fungi on nutrition, growth and development of *Capsicum annuum* L. *Scientia Horticulturae* 45:333-338.
- Davies, F. T. 2000. Benefits and oportunities with mycorrhizal fungi in nursery propagation and production system. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society* 50:482-489.
- Davies, F. T. 2005. Influence of arbuscular mycorrhizae indigenous to Peru and a flavonoid on growth, yield, and leaf elemental concentration of "Yungay" potatoes. *HortScience* 40(2):381-385.
- Díaz-Franco, A. and Garza-Cano, I. 2006. Colonización micorrízica arbuscular y crecimiento de genotipos de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*). *Rev. Fitotec. Mex.* 29(3):203-206.
- Díaz-Franco, A. and Garza-Cano, I. 2007. Growth of sorghum and safflower genotypes associated with arbuscular mycorrhizal colonization in low fertility soil. *Universidad y Ciencia* 23(1):15-20.
- Estrada-Luna, A. A. and Davies, F. T. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *Journal of Plant Physiology* 160:1073-1083.
- Gardezi, A. K.; Cetina, V. M.; Talavera, D.; Ferrera, R.; Rodríguez, F. y Larqué, M. 2000. Efecto de inoculación con endomicorriza arbuscular y dosis creciente de fertilización fosfatada en el crecimiento de chapulxtle (*Dodonaea viscosa*). *Terra* 18:153-159.
- The presence of HMA as *G. coremioides* and *G. sinuossum* in the apple orchard may be responsible for the survival and current production rate of apple trees.
- HMA combination with 22 µg ml⁻¹ of P is established as a promising alternative for horticultural production.

End of the English version



- Gerderman, J. and Nicholson, T. 1963. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235-244.
- Guissou, T. 2009. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to growth and nutrient uptake by jujube and tamarind seedlings in a phosphate (P)-deficient soil. *African J. Microbiol. Res.* 3(5):297-304.
- Hewitt, E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communication No. 22 of the Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops. Commonwealth Agricultural Bureaux. Great Britain. 547 p.
- López-Bucio, J.; Hernández-Abreu, E.; Sánchez-calderón, L.; Nieto-Jacobo, M. F.; Simpson, J. and Herrera-Estrella, L. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* 129:244-256.
- Phillips, J. M. and Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55(1):158-161.
- Rubí-Arriaga, M.; González-Huerta, A.; Castillo-González, A. M.; Olalde-Portugal, V.; Reyes-Reyes, B. G. y Aguilera-Gómez, L. I. 2009. Respuesta de *Lilium* sp. al fósforo y su relación con *Glomus fasciculatum* y *Bacillus subtilis*. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 78:91-100.
- Rubí-Arriaga, M.; González-Huerta, A.; Olalde-Portugal, V.; Reyes-Reyes, B. G.; Castillo-González, A. M.; Pérez-López, D. de J. y Aguilera-Gómez, L. I. 2012. Contribución de fósforo al mejoramiento de calidad en *Lilium* y la relación con *Glomus fasciculatum* y *Bacillus subtilis*. *Rev. Mexi. de Cienc. Agríc.* 13(1):125-139.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd edition. Academic Press. Hortcourt Brace and Co. Publishers. London. 605 p.