

Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion

Micorrización de *Agave cupreata*: Biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción del crecimiento vegetal

Jesús Rafael Trinidad-Cruz, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar, Gabriel Rincón-Enríquez*, Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco, México; Luis López-Pérez, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, C.P. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México; Laura Verónica Hernández-Cuevas, Laboratorio de Micorrizas, Centro de Investigación de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km 10.5 Carretera San Martín Texmelucan-Tlaxcala S/N, San Felipe Ixtacuixtla, C.P. 90120, Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, Tlaxcala, México. *Autor para correspondencia: grincon@ciatej.mx.

Recibido: 18 de Julio, 2016.

Aceptado: 06 de Enero, 2017.

Trinidad-Cruz JR, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G, López-Pérez L, Hernández-Cuevas LV. 2017. Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 151-169.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1607-5

Primera publicación DOI: 05 de marzo, 2017.

First DOI publication: March 05, 2017.

Resumen. Se evaluó el efecto de la inoculación micorrícica de plantas de *Agave cupreata* en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* y en la promoción del crecimiento vegetal. En invernadero, semillas de *A. cupreata* fueron inoculadas con cuatro consorcios de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) nativos, denominados El Huizachal (EH), Agua Dulce (AD), Paso Ancho (PA) y Cerro del Metate (CM), un inóculo comercial micorriza INIFAP®

Abstract. The effect of mycorrhizal of *Agave cupreata* in the biocontrol of *Fusarium oxysporum* and promoting plant growth was evaluated. In greenhouse, seeds of *A. cupreata* were inoculated with four consortia of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) native: The Huizachal (EH), Agua Dulce (AD), Paso Ancho (PA) and Cerro del Metate (CM), a commercial inoculum mycorrhizal INIFAP® (MI) and a control without AMF. Seven months after inoculating of the AMF, in a group of plants with and without mycorrhizal was evaluated the promoting plant growth and another similar group of plants were inoculated with or without *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) to evaluate the potential biocontrol effect of AMF. The results showed that mycorrhizal plants increased significantly (Tukey, $p \leq 0.05$) dry biomass total, in a range between 148 and 239 % more than the control without AMF. At 240 days after inoculation of Fox; the treatments PA+Fox and MI+Fox showed

(MI) y un testigo sin HMA. Siete meses después de inocular los HMA, en un grupo de plantas micorrizadas y sin micorrizar se evaluó la promoción del crecimiento vegetal y otro grupo similar de plantas fueron inoculadas con o sin *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) para evaluar el potencial efecto de biocontrol de los HMA. Los resultados mostraron que la micorrización incrementó significativamente (Tukey, $p \leq 0.05$) la biomasa seca total de las plantas, en un intervalo entre 148 y 239 % más con respecto al testigo sin HMA. A los 240 días después de la inoculación de Fox, los tratamientos PA+Fox y MI+Fox mostraron un efecto significativo (Kruskal-Wallis, $p \leq 0.05$) en la disminución de la severidad de la marchitez del agave con un promedio de daño de 33 % con respecto al testigo+Fox que presentó daños de 74 %. PA y MI pueden considerarse como potenciales biofertilizantes y agentes de biocontrol de *F. oxysporum* en el cultivo del agave.

Palabras clave: Hongos micorrícicos arbusculares, consorcios nativos de HMA, marchitez del agave, *Rhizophagus intraradices*, bioprotección contra fitopatógenos.

INTRODUCCIÓN

Agave cupreata es una especie endémica de la Cuenca del Balsas, México. Su cultivo se ha intensificado debido a que a partir de la fermentación del jugo de las piñas de las plantas adultas se produce una bebida alcohólica artesanal conocida como mezcal (Martínez-Palacios *et al.*, 2011). En el estado de Michoacán, en alrededor de 29 municipios se produce mezcal a partir de esta especie de agave. Durante el año 2013, estos municipios obtuvieron la denominación de origen del mezcal (DOM), lo cual traerá beneficios dentro de los que se incluye su exportación (Gobierno de Michoacán,

a reducing significant (Kruskal-Wallis, $p \leq 0.05$) in the severity of agave wilt, averaging 33 % damage compared to the control+Fox, which presented damage of 74 %. PA and MI may be considered as potential biofertilizers and biocontrol agents of *F. oxysporum* in the cultivation of agave.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF native consortia, agave wilt, *Rhizophagus intraradices*, bioprotection against plant-pathogens.

INTRODUCTION

Agave cupreata is an endemic species of the Balsas river basin, in Mexico. Its growth has become intensified since the juice obtained from the heart of adult plants is fermented to produce an alcoholic beverage known as mezcal (Martínez-Palacios *et al.*, 2011). In the state of Michoacán, in approximately 29 municipalities, mezcal is produced using this species of agave. During the year 2013, these municipalities obtained the *denominación de origen* of mezcal (DOM), which will bring benefits including its export (Michoacán government, 2012). Due to this, an increase is expected in the surface of *A. cupreata* planted, which will require an adequate agronomic and plant health management to maintain this crop's sustainability, as is the case for other agaves (*A. angustifolia* and *A. potatorum*) used in the production of mezcal in southeastern Mexico (Aguirre-Dugua and Eguiarte, 2013). The increase in the surface for the plantation of this crop could increase the incidence of diseases, as in the case of plantations of *A. tequilana* (Ávila-Miranda *et al.*, 2010). The wilting caused by the fungus *Fusarium oxysporum* is one of the plant health problems that significantly affects the productivity of tequila agave; the infection process begins in the roots,

2012). Debido a esto, se espera un incremento en la superficie cultivada de *A. cupreata*, por lo que será necesario efectuar un manejo agronómico y fitosanitario adecuados para mantener la sustentabilidad de este cultivo, como se efectúa para otros agaves (*A. angustifolia* y *A. potatorum*) empleados en la producción de mezcal en el sureste de México (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013). El incremento en la superficie del cultivo potencialmente podría incrementar la incidencia de enfermedades como ha sucedido en plantaciones de *A. tequilana* (Ávila-Miranda *et al.*, 2010). La marchitez causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* es uno de los problemas fitosanitarios que afecta significativamente la productividad del agave tequilero; el proceso de infección se inicia en las raíces, posteriormente se observa un enrollamiento y muerte en las puntas de las hojas, que culmina con la marchitez de toda la planta (Vega-Ramos *et al.*, 2013). Esta problemática fitosanitaria también se presenta en plantaciones de *A. cupreata* en el estado de Michoacán.

El control convencional de hongos fitopatógenos a través de la aplicación de fungicidas no ha sido efectivo, además de que estos productos originan problemas ambientales, deterioran el suelo, generan resistencia e incrementan los costos de producción (Bernal-Alcocer *et al.*, 2005). En las últimas décadas, el biocontrol ha sido una de las estrategias para controlar diferentes enfermedades en plantas a través del uso de microorganismos benéficos los cuales suprimen la densidad de población o el impacto de patógenos, por lo que se reduce su abundancia o efecto dañino (Eilenberg, 2006). Dentro de los microorganismos con capacidad de biocontrol se encuentran los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). Los HMA forman simbiosis con alrededor de 80 % de las plantas terrestres. En esta asociación, las hifas simbióticas del hongo micorrícico transportan nutrientes del suelo hacia la

followed by the tips of leaves curling and dying, and finally, the entire plant wilts (Vega-Ramos *et al.*, 2013). This plant health problem also appears in *A. cupreata* plantations in the state of Michoacán.

The conventional control of disease-inducing fungi with fungicides has not been effective and these products also cause environmental problems, deteriorate the soil, create resistance, and increase production costs (Bernal-Alcocer *et al.*, 2005). In the last few decades, biocontrol has been one of the strategies to control different plant diseases with the use of beneficial microorganisms that suppress the population density or the impact of pathogens, reducing their abundance or harmful effect (Eilenberg, 2006). Among the microorganisms with the capability of biocontrol are the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). AMFs form a symbiosis with around 80 % of terrestrial plants. In this association, the symbiotic hyphae of the mycorrhizal fungi transport nutrients from the soil to the plant which, in compensation, provides the fungus space and a source of carbon, which is exchanged through the arbuscles (Smith and Read, 2008). Several authors have reported that mycorrhized plants can cause, in most cases, a reduction in the incidence and/or severity of diseases caused by diverse plant pathogens of the soil, including *Fusarium oxysporum* (Akhtar and Siddiqui, 2008; Saldajeno *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2008). Hage-Ahmed *et al.* (2013) found that the inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) with a commercial AMF inoculant (Symbivit[®]) reduced the incidence of the disease caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by 35%. Hu *et al.* (2010) inoculated cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) with a native AMF consortium (*Glomus* spp. *sensu lato* and *Acaulospora* spp.) and found an effect on the suppression of wilting caused by *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in regard to plants inoculated only with the pathogen. Jaiti *et al.* (2007)

planta y ésta en compensación le brinda espacio y una fuente de carbono al hongo que es intercambiada a través de los arbuscúlos (Smith y Read, 2008). Diversos autores han reportado que las plantas micorrizadas pueden originar en la mayoría de los casos una reducción de la incidencia y/o severidad de las enfermedades causadas por diversos fitopatógenos del suelo incluyendo a *Fusarium oxysporum* (Akhtar y Siddiqui, 2008; Saldajeno *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2008). Hage-Ahmed *et al.* (2013) encontraron que la inoculación de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con un inóculo comercial de HMA (Symbivit®) generó una disminución de 35 % en la incidencia de la enfermedad provocada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Hu *et al.* (2010) inocularon plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) con un consorcio nativo de HMA (*Glomus* spp. *sensu lato* y *Acaulospora* spp.) y encontraron un efecto en la supresión de la marchitez causada por *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* con respecto a las plantas inoculadas sólo con el patógeno. Jaiti *et al.* (2007) mostraron que plantas de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) inoculadas con un consorcio nativo de HMA presentaron una disminución de la mortalidad de 56 % con respecto a plantas no micorrizadas cuatro meses después de la inoculación con *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*. A pesar de lo anterior, aun no hay reportes del biocontrol de *F. oxysporum* en *A. cupreata* por los HMA. Por otra parte, se ha reportado el uso de HMA en la promoción del crecimiento de algunas especies de agave. Cui y Nobel (1992) encontraron diferencias significativas en el contenido de P en raíz y la parte aérea en plantas de *Agave deserti* inoculadas con un consorcio nativo de HMA integrado por especies del género *Glomus sensu lato*, en contraste con las plantas no micorrizadas. Robles-Martínez *et al.* (2013) observaron incrementos en el peso seco de la parte aérea y en el contenido de P en plantas de *A. angustifolia* inoculadas con diferentes

showed that date palms (*Phoenix dactylifera* L.) inoculated with a native AMF consortium presented a reduction in mortality by 56 % in regard to plants not mycorrhized four months after inoculation with *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*. Despite this, there are still no reports on the biocontrol of *F. oxysporum* in *A. cupreata* by AMFs.

On the other hand, there have been reports on the use of AMFs in the enhancement of growth of some agave species. Cui and Nobel (1992) found significant differences in the content of P in the root and aerial section of *Agave deserti* plants inoculated with a native AMF consortium composed of species of the genus *Glomus sensu lato*, in contrast with non-mycorrhized plants. Robles-Martínez *et al.* (2013) observed increases in the dry weight of the aerial section and the content of P in *A. angustifolia* plants inoculated with different native AMF consortia or with *Rhizophagus intraradices* (synonymous with *Glomus intraradices*) in regard to non-inoculated plants. This highlights, on the one hand, the beneficial effect of AMFs in plant growth, and on the other, its biocontrol capability on *F. oxysporum*. The aim of this investigation was to evaluate the effect of mycorrhizal inoculation of *Agave cupreata* plants on the biocontrol of *Fusarium oxysporum* and in the enhancement of plant growth.

MATERIALS AND METHODS

Mycorrhizal inoculant

We used spores from four AMF consortia, native of the state of Michoacán, contained in sand, and a commercial inoculant [mycorrhiza INIFAP® (MI)]. The spores of four native consortia were multiplied on trap plants of hybrid sorghum (Sweet Chow, Western Seed Co.), belonging to the

consorcios nativos de HMA o con *Rhizophagus intraradices* (sinónimo *Glomus intraradices*) con respecto a plantas no inoculadas. Lo anterior destaca por un lado el efecto benéfico de los HMA en el crecimiento vegetal y por otro su capacidad de biocontrol sobre *F. oxysporum*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación micorrícica de plantas de *Agave cupreata* en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* y en la promoción del crecimiento vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inóculo micorrícico

Se utilizaron esporas de cuatro consorcios de HMA, nativos del estado de Michoacán contenidas en arena y un inóculo comercial [micorriza INIFAP® (MI)]. Las esporas de los cuatro consorcios nativos fueron obtenidas de cultivos trampa en propagación con sorgo híbrido (Sweet Chow, Western Seed Co.), pertenecientes a la colección de consorcios nativos de HMA del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Los consorcios nativos empleados fueron denominados El Huizachal (EH) (*Acaulospora morrowiae*, *A. spinosa*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Funneliformis geosporum* y *F. mosseae*), Cerro del Metate (CM) (*A. mellea*, *A. scrobiculata*, *C. etunicatum* y *F. geosporum*), Paso Ancho (PA) (*A. spinosa*, *C. claroideum*, *C. etunicatum* y *Glomus* sp. 1) y Agua Dulce (AD) (*A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *C. etunicatum*, *F. geosporum*, *F. mosseae* y *Rhizophagus clarus*) (Reyes-Tena *et al.*, 2016). El inóculo comercial MI, contuvo esporas de *R. intraradices*. Para inocular la cantidad de esporas requeridas en el experimento, se realizó el conteo de esporas de los consorcios nativos y del inóculo comercial

collection of native AMF consortia from the Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (Center for Research and Assistance in Technology and Design of the State of Jalisco, or CIATEJ). The native consortia used were named El Huizachal (EH) (*Acaulospora morrowiae*, *A. spinosa*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Funneliformis geosporum*, and *F. mosseae*), Cerro del Metate (CM) (*A. mellea*, *A. scrobiculata*, *C. etunicatum*, and *F. geosporum*), Paso Ancho (PA) (*A. spinosa*, *C. claroideum*, *C. etunicatum*, and *Glomus* sp. 1), and Agua Dulce (AD) (*A. morrowiae*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *C. etunicatum*, *F. geosporum*, *F. mosseae*, and *Rhizophagus clarus*) (Reyes-Tena *et al.*, 2016). The commercial inoculant MI, withheld *R. intraradices* spores. To inoculate the amount of spores required in the experiment, the spores from the native consortia and the commercial inoculant were counted, taking 10 g of dry soil to extract the spores using the dry sieving technique, decantation (Gerdemann and Nicolson, 1963), and centrifuging with saccharose at 50 % (Brundrett *et al.*, 1996) three times. The spores were counted in a stereomicroscope (VE-S6, VELAB^{MR}). From each inoculant, 4-10 g were taken to inoculate with 100 AMF spores per agave seed, and for the control without AMF, 10 g of dry sand were inoculated for each seed.

Fusarium oxysporum FPC (Fox) inoculant

The isolate *F. oxysporum* FPC was obtained from the collection of pathogenic fungi of CIATEJ Plant Biotechnology. This isolate was taken from *A. tequilana* plants with symptoms of wilting (Qui-Zapata *et al.*, 2011) and previously (Trinidad-Cruz *et al.*, 2013) its pathogenic activity was tested against *A. cupreata*. From a FoxFPC conservation plantation, a mycelium transfer was carried out to reactivate the isolate in Petri dishes (90 mm in

tomando 10 g de suelo seco para extraer las esporas mediante la técnica de tamizado húmedo, decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963) y centrifugación con sacarosa al 50 % (Brundrett *et al.*, 1996) por triplicado. Las esporas fueron contadas en un estéreomicroscopio (VE-S6, VELAB^{MR}). De cada inóculo se tomaron entre 4-10 g para inocular con 100 esporas de HMA por semilla de agave y para el testigo sin HMA se inocularon 10 g de arena esterilizada por semilla.

Inóculo de *Fusarium oxysporum* FPC (Fox)

La cepa FPC de *F. oxysporum* fue obtenida de la colección de hongos fitopatógenos de Biotecnología Vegetal del CIATEJ. Esta cepa fue aislada de plantas de *A. tequilana* con síntomas de marchitez (Qui-Zapata *et al.*, 2011) y previamente (Trinidad-Cruz *et al.*, 2013) se comprobó su actividad fitopatógena en contra de *A. cupreata*. A partir de un cultivo de conservación de FoxFPC, se realizó una transferencia de micelio para reactivar la cepa en placas Petri (90 mm de diámetro) con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA DIFCO) estéril (121 °C, 1.05 kg cm⁻², 20 min); las placas fueron incubadas a 27±1 °C durante 11 días en oscuridad, seguidos de cuatro días con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). Después de 15 días de crecimiento, se recolectaron las esporas de FoxFPC, para ello se agregaron 15 mL de agua destilada estéril (121 °C, 1.05 kg cm⁻², 20 min) en cada placa Petri. Con ayuda de un pincel estéril se realizó un barrido suave sobre la superficie del medio de cultivo y se recuperó el agua destilada con las esporas con ayuda de una micropipeta y puntas esterilizadas. La concentración de esporas se ajustó a 1×10⁶ esporas mL⁻¹ con ayuda de un hematocitómetro. La suspensión de esporas se almacenó en tubos de 50 mL de capacidad a 4 °C hasta su uso.

diameter) with a sterile potato-dextrose-agar (PDA DIFCO) medium (121 °C, 1.05 kg cm⁻², 20 min); the Petri dishes were incubated at 27±1 °C for 11 days, followed by 4 days with a photoperiod of 16/8 h (light/darkness). After 15 days of growth, the FoxFPC spores were gathered; this was carried out by adding 15 mL of sterile distilled water (121 °C, 1.05 kg cm⁻², 20 min) in each Petri dish. Using a sterile brush, the surface of the culture medium was softly swept, and the distilled water with the spores was recovered using a micropipette and sterilized tips. The concentration of spores was adjusted to 1×10⁶ spores mL⁻¹ using a hemocytometer. The spore suspension was stored in 50 mL tubes at 4 °C until use.

Preparation of the *F. oxysporum* FPC substrate

Before inoculating the substrate with Fox, oat flakes were used to increase the amount of Fox propagules in plastic, 1 L containers with 60 g of oat flakes, hydrated with 50 mL of distilled water, sterilized earlier (121 °C, 1.05 kg cm⁻², 20 min). The oat flakes were inoculated with 10 mL of the spore suspension at a concentration of 1×10⁶ spores mL⁻¹ and incubated in the dark for 15 days at room temperature. After this time, the number of colony forming units (CFU) per gram of oat was determined. One gram of oat was placed under serial decimal dilutions and the dilutions were planted 10⁻⁴ to 10⁻⁶ in a Petri dish with a PDA culture medium with Bengal Rose (25 mg L⁻¹) threefold; the dishes were incubated at 27±1 °C for 2 days in the dark before they were counted. After determining the number of CFU, the oat flakes with the Fox propagules were vigorously mixed with a sterile substrate mixture (sand-peat of sphagnum -agrolite, 4:1:1, v:v:v) adjusting a final concentration of 1×10⁴ UFC g⁻¹ of dry substrate.

Preparación del sustrato de *F. oxysporum* FPC

Previamente a la inoculación del sustrato con Fox, se utilizaron hojuelas de avena para incrementar la cantidad de propágulos de Fox en recipientes de plástico de 1 L de capacidad con 60 g de hojuelas de avena hidratadas con 50 mL de agua destilada, previamente esterilizados (121 °C, 1.05 kg cm⁻², 20 min). Las hojuelas de avena fueron inoculadas con 10 mL de la suspensión de esporas a una concentración de 1×10⁶ esporas mL⁻¹ y se incubaron en oscuridad durante 15 días a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de avena. Un gramo de avena se sometió a diluciones decimales seriadas y se sembraron las diluciones 10⁻⁴ a 10⁻⁶ en placa Petri con medio de cultivo PDA con rosa de bengala (25 mg L⁻¹) por triplicado; las placas fueron incubadas a 27 ± 1 °C durante dos días en oscuridad antes de realizar el conteo. Una vez determinado el número de UFC, las hojuelas de avena con los propágulos de Fox fueron mezclados vigorosamente con una mezcla de sustrato estéril (arena-turba de esfagno-agrolita, 4:1:1, v:v:v) ajustando a una concentración final de 1×10⁴ UFC g⁻¹ de sustrato seco.

Material vegetal

Las plántulas de *A. cupreata* fueron obtenidas a partir de semillas desinfectadas con una solución de cloro comercial a 3 % (cloro activo al 6 %) durante 10 min y después fueron enjuagadas con agua destilada, tres veces, durante 5 min cada vez. Las semillas se sembraron en charolas de plástico de 38 cavidades y se colocaron dentro de un contenedor de agua de aproximadamente 4 L. Se sembró una semilla por cada cavidad, la cual contenía como sustrato 30 g de una mezcla de arena-agrolita (4:1, v:v) esterilizada (120 °C, 1.05 kg cm⁻², 6 h).

Plant material

The *A. cupreata* plantlets were obtained from seeds disinfected with a commercial 3 % chlorine solution (active chlorine at 6 %) for 10 min and then rinsed using distilled water, three times, for 5 min each time. The seeds were planted in plastic trays with 38 holes and placed inside a container with approximately 4 L of water. One seed was planted in each hole, which contained, as a substrate, 30 g of a mixture of sand-agrolite (4:1, v:v), sterilized (120 °C, 1.05 kg cm⁻², 6 h).

Inoculation of AMF in *Agave cupreata* plants

To evaluate the promotion of the AMF growth, each agave seed was inoculated with 100 AMF spores directly into the planting orifice of each of the four native consortia (CM, PA, EH, and AD), the commercial inoculant MI or 10 g of sterile sand for the control without AMF. The trays with the inoculated seeds remained under greenhouse conditions and were watered with distilled water twice a week; starting three months after planting, they were fertilized with a nutritious solution (Jarstfer and Sylvia, 1992) low in phosphorous (3 µM) with a pH of 6.1±0.1 every two weeks. We added 1.5 L of the nutritious solution into each container; if plants needed water between fertilizations, then were added distilled water. Six months after planting, the nutrient solution was suspended, and irrigated with distilled water until the ending of the experiment.

To evaluate the effect of the Fox biocontrol, mycorrhized seven month old *A. cupreata* plants contained in trays were transplanted with their rootballs into expanded 250 mL polystyrene cups, which were added between 65 and 75 g of the mixture of substrate sand-peat of sphagnum -agrolite (4:1:1, v:v:v) sterilized (120 °C, 1.05 kg cm⁻², 6 h);

Inoculación de HMA en plantas de *Agave cupreata*

Para evaluar la promoción del crecimiento de los HMA, cada semilla de agave fue inoculada con 100 esporas de HMA directamente al orificio de siembra de cada uno de los cuatro consorcios nativos (CM, PA, EH y AD), el inóculo comercial MI o 10 g de arena estéril para el testigo sin HMA. Las charolas con las semillas inoculadas permanecieron en condiciones de invernadero y fueron regadas con agua destilada dos veces por semana; a partir de los tres meses después de la siembra, fueron fertilizadas con solución nutritiva (Jarstfer y Sylvia, 1992) baja en fósforo (3 μ M) con un pH de 6.1 ± 0.1 cada dos semanas. Se adicionó 1.5 L de la solución nutritiva en cada contenedor; si las plantas necesitaban agua entre cada fertilización, se les agregó agua destilada. Seis meses después de la siembra se suspendió la aplicación de solución nutritiva y se regó con agua destilada hasta concluir el experimento.

Para evaluar el efecto de biocontrol de Fox, plantas de *A. cupreata* micorrizadas de siete meses de edad contenidas en charolas fueron trasplantadas con su cepellón a vasos de poliestireno expandido (unicel) de 250 mL, a los que se les agregaron entre 65 a 75 g de la mezcla de sustrato arena-turba de esfagno-agrolita (4:1:1, v:v:v) esterilizada (120 °C, 1.05 kg cm⁻², 6 h); según el tratamiento correspondiente se agregó el sustrato con Fox a una concentración de 1×10^4 UFC g⁻¹ o sustrato sin Fox. Las plantas fueron separadas para evitar la contaminación; para ello, las plantas previamente trasplantadas e inoculadas con Fox fueron ubicadas dentro de siete charolas de plástico (18 vasos de unicel por charola) y colocadas en una incubadora refrigerada (Thermo Scientific™, Modelo Precision 3759) a 28 °C de temperatura y fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). El otro grupo de plantas sin inocula-

dependiendo on the corresponding treatment, we added the Fox substrate at a concentration of 1×10^4 UFC g⁻¹ or substrate without Fox. The plants were separated to avoid contamination; for this, those previously transplanted and inoculated with Fox were placed in seven plastic trays (18 styrofoam cups per tray) and into a refrigerated incubator (Thermo Scientific™, Model Precision 3759) at 28 °C and a photoperiod of 16/8 h (light/dark). The other group of plants without Fox inoculation were placed in five plastic trays (23 styrofoam cups per tray) in an incubation room for plant growth at 27 ± 1 °C and a photoperiod of 16/8 h (light/dark). All plants were irrigated with distilled water twice a week.

Experimental design and response variables

To evaluate the promotion of the growth of *A. cupreata* plants, a completely random design was established, in which six treatments were evaluated, one for each AMF (EH, CM, PA, AD, and MI) and a control without AMF. Five and three repetitions were used with AMF and control, respectively. Each plant represented one experimental unit. Seven months after inoculation with AMF, the number of leaves, the dry weight of the foliage and of the roots, and the total dry biomass (dried foliage samples and roots at 60 °C until weight was constant), were evaluated. Finally, in order to observe the colonization of the agave roots with the AMFs, roots were lightened and stained using the technique proposed by Phillips and Hayman (1970); later, photographs were taken of the typical structures of the mycorrhiza, using a digital camera (Leica DFC450C, Leica Application Suite LAS ver. 4.1.0 software) adapted to an optic microscope.

To evaluate the effect of the Fox biocontrol, we used a completely random design with a factorial arrangement in which 12 treatments were evaluated,

ción de Fox fueron colocadas en cinco charolas de plástico (23 vasos de unicel por charola) en un cuarto de incubación para crecimiento de plantas a 27 ± 1 °C de temperatura y fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). Todas las plantas fueron regadas con agua destilada dos veces por semana.

Diseño experimental y variables de respuesta

Para evaluar la promoción del crecimiento de las plantas de *A. cupreata*, se estableció un diseño completamente al azar en donde se evaluaron seis tratamientos, uno para cada HMA (EH, CM, PA, AD y MI) y un testigo sin HMA. Se utilizaron cinco y tres repeticiones para los tratamientos con HMA y testigo, respectivamente. Cada planta representó una unidad experimental. A los siete meses después de la inoculación con HMA, se evaluó el número de hojas, el peso fresco del follaje y de las raíces, así como la biomasa seca total (secado de las muestras de follaje y de raíces en estufa a 60 °C hasta peso constante). Finalmente, con el objetivo de observar la colonización de las raíces de agave por los HMA se realizó el clareo y tinción de raíces mediante la técnica propuesta por Phillips y Hayman (1970); posteriormente se tomaron registros fotográficos de las estructuras típicas de la micorriza con una cámara digital (Leica DFC450C, Leica Application Suite LAS ver. 4.1.0 software) acoplada al microscopio óptico.

Para evaluar el efecto de biocontrol de Fox, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial en donde se evaluaron 12 tratamientos, resultantes de la combinación de los factores: 1) inoculación con HMA (seis niveles: CM, PA, EH, AD, MI y testigo sin hongo micorrízico); 2) inoculación con Fox (dos niveles: con y sin patógeno). Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento; se consideró como unidad experimental a una planta de *A. cupreata* contenida en una maceta. Se evaluó el grado

resulting from the combination of the factors: 1) inoculation with AMF (six levels: CM, PA, EH, AD, MI, and a control without the mycorrhizal fungus); 2) inoculation with Fox (two levels: with and without the pathogen). Ten repetitions were used per treatment; one *A. cupreata* plant held in a pot was considered an experimental unit. The degree of the disease severity (DS) was evaluated according to the scale proposed by De Cal *et al.* (2000): 1 (DS del 0 %)= healthy plant; 1.1 to 1.9 (DS de 1 a 24 %)= the first yellow leaf; 2 to 2.9 (DS de 25 a 49 %)= more than one yellow lower leaf and first dead leaf; 3 to 3.9 (DS de 50 a 74 %)= lower leaves dead and some upper leaves dead; 4 to 4.9 (DS of 75 to 99 %)= lower leaves dead and upper leaves wilted; and 5 (DS of 100 %)= dead plant. The degree of DS was determined 240 days after inoculation with the pathogen, fifteen months after the initial experiment was established.

Statistical analysis

The plant growth variables were analyzed with an analysis of variance and Tukey's range test ($p\leq 0.05$). The DS data were analyzed with the non-parametric Kruskal-Wallis statistical test ($p\leq 0.05$) and trust intervals of the median ($p\leq 0.05$). Analyses were carried out using the statistical package StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2005).

RESULTS

Statistical differences were found (Tukey, $p\leq 0.05$) between the native consortia and the control without AMF for all the growth enhancement variables evaluated seven months after inoculation (Table 1). The native consortia named El Huizachal (EH), Agua Dulce (AD) and the commercial inoculant (MI) increased *A. cupreata* plant growth

de severidad de la enfermedad (SE) de acuerdo con la escala propuesta por De Cal *et al.* (2000): 1 (SE del 0 %) = planta sana; 1.1 a 1.9 (SE de 1 a 24 %) = la primera hoja amarilla; 2 a 2.9 (SE de 25 a 49 %) = más de una hoja inferior amarilla y primera hoja muerta; 3 a 3.9 (SE de 50 a 74 %) = hojas inferiores muertas y algunas hojas superiores amarillas; 4 a 4.9 (SE de 75 a 99 %) = hojas inferiores muertas y hojas superiores marchitas; y 5 (SE del 100 %) = planta muerta. El grado de SE fue determinado a los 240 días después de la inoculación con el patógeno, quince meses después de establecido el experimento inicial.

Análisis estadístico

Las variables de crecimiento vegetal fueron analizadas mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias Tukey ($p \leq 0.05$). Los datos de SE fueron analizados con la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$) e intervalos de confianza de la mediana ($p \leq 0.05$). Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2005).

RESULTADOS

Se encontraron diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) entre los consorcios nativos y el testigo sin HMA para todas las variables de promoción de crecimiento evaluadas siete meses después de la inoculación (Cuadro 1). Los consorcios nativos denominados El Huizachal (EH), Agua Dulce (AD) y el inóculo comercial (MI) incrementaron el crecimiento de las plantas de *A. cupreata* (Figura 1A). En estos consorcios nativos existió un incremento de dos a tres hojas; de peso fresco de follaje del 186, 168 y 154 %; de peso fresco de raíces del

(Figura 1A). In these native consortia, there was an increase of two to three leaves; in dry weight, of 186, 168, and 154 %; in the fresh weight of leaves, of 273, 196, and 282 % (Figure 1B) respectively, all in comparison to the control without AMF. For the total dry biomass variable, all native consortia and MI increased their biomasses between 148 and 239 % in comparison with the control without AMF (Table 1) (Figure 1C).

On the other hand, symptoms of wilting were observed starting on day 20 after inoculation with Fox (ddif); in this time, the average disease severity (DS) in the treatments FoxFPC was between 1.08 and 1.32 (first yellow lower leaf, damage in plant between 2.8 and 8 %). Typical symptoms such as chlorosis (Figure 2A), and curling and death of the tips of leaves (Figure 2B and 2C) and wilting of the entire plant (Figure 2D) were observed throughout the experiment. The DS in the treatments PA+Fox and MI+Fox (240 ddif) was lower than in the treatment control+Fox (Kruskal-Wallis, $p \leq 0.05$) (Figure 3). Treatments PA+Fox and MI+Fox presented an average of 41 % less damage in agave plants (DS of 2.3, more than one yellow lower leaf and first dead leaf) with regard to the treatment control+Fox, which displayed an average of 74 % damage in plants (DS of 3.9, lower leaves dead and some yellow upper leaves). The treatments with consortia EH, CM, and AD did not seem to have an effect on the biocontrol of *F. oxysporum* FPC (Figure 3).

DISCUSSION

Inoculation with the native AMF consortia and the inoculant MI promoted the growth of *A. cupreata* plants significantly, although the response to the inoculation with AMF in other agave species has been variable. For *A. tequilana*, Ruiz

Cuadro 1. Efecto de distintos consorcios nativos y un inoculante comercial de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento vegetal de plantas de *Agave cupreata* siete meses después de la inoculación en condiciones de invernadero.**Table 1. Effect of different native consortia and a commercial Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) inoculant on the plant growth of *Agave cupreata* seven months after inoculation under greenhouse conditions.**

Inóculo micorrízico	Número de hojas	Peso fresco (g)		Biomasa seca total (g)
		Follaje	Raíz	
Cerro del Metate	5.8ab	12.4 ± 2.7bc	2.0 ± 0.6a	1.9 ± 0.5a
Paso Ancho	5.8ab	10.7 ± 1.0cd	1.5 ± 0.3ab	1.8 ± 0.2a
El Huizachal	6.6a	19.3 ± 0.9a	2.0 ± 0.2a	2.4 ± 0.2a
Agua Dulce	7.0a	18.1 ± 3.8a	1.7 ± 0.6a	2.4 ± 0.5a
Micorriza INIFAP®	6.2a	17.1 ± 2.1ab	2.1 ± 0.4a	2.4 ± 0.4a
Testigo sin HMA	4.3b	6.7 ± 2.6d	0.6 ± 0.3b	0.7 ± 0.3b

Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$); \pm desviación estándar. Tratamientos con HMA, $n=5$; testigo sin HMA, $n=3$ / Values with the same letter in each column are statistically equal (Tukey, $p \leq 0.05$); \pm standard deviation. Treatments with AMF, $n=5$; control without AMF, $n=3$.

273, 196 y 282 % (Figura 1B); respectivamente, en comparación con el testigo sin HMA. Para la variable biomasa seca total todos los consorcios nativos y MI incrementaron la biomasa entre 148 a 239 % con respecto al testigo sin HMA (Cuadro 1) (Figura 1C).

Por otra parte, los síntomas de la marchitez fueron observados desde los 20 días después de la inoculación con Fox (ddif), a este tiempo la severidad de la enfermedad (SE) en los tratamientos con FoxFPC fue en promedio entre 1.08 a 1.32 (primera hoja inferior amarilla, daño en planta entre 2.8 a 8 %). Los síntomas típicos como clorosis (Figura 2A), enrollamiento y muerte en las puntas de las hojas (Figura 2B y 2C) y marchitez de toda la planta (Figura 2D) fueron observados durante el transcurso del experimento. La SE en los tratamientos PA+Fox y MI+Fox (240 ddif) fue menor que en el tratamiento testigo+Fox (Kruskal-Wallis, $p \leq 0.05$) (Figura 3). Los tratamientos PA+Fox y MI+Fox presentaron en promedio 41 % menos daño en las plantas de agave (SE de 2.3, más de una hoja inferior amarilla y la primera hoja muerta) con respecto al tratamiento Testigo+Fox que presentó en

et al. (2011) found that plants *in vitro* inoculated with *R. intraradices* did not display significant differences in the variables evaluated, such as the number of leaves, plant height, fresh weight, and dry weight in regard to the non-inoculated control, 263 days after inoculation. Pimienta-Barrios *et al.* (2009) did not find significant differences either in the growth of *A. tequilana* plants inoculated with *R. intraradices* or *R. fasciculatus* in regard to plants not inoculated with AMF. In contrast, Robles-Martínez *et al.* (2013) found significant differences in regard to plants without AMF for the dry weight of foliage in *A. angustifolia* plants inoculated with *R. intraradices* or with at least one native consortium, 98 days after inoculation. This variability in the response of the growth of agave plants associated with AMF can be explained by several factors, such as the AMF species (native consortia or monospecies plantations), the functional complementarity or synergism of the AMFs, and to the response of each host (high or low dependence to AMFs) (Gustafson and Casper, 2006; Jansa *et al.*, 2008; Camprubi *et al.*, 2011). The capability and efficiency of the AMFs to absorb P

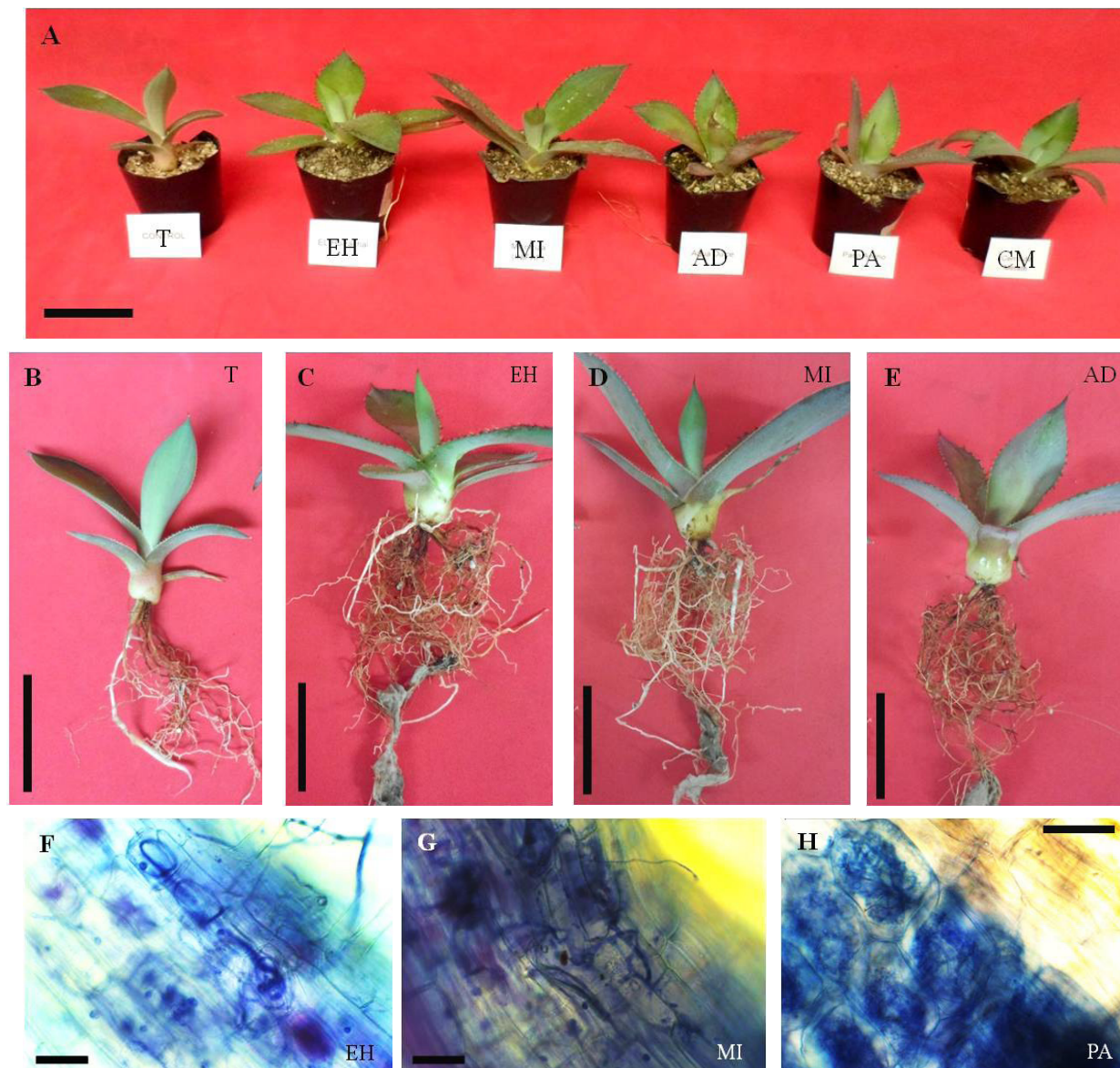


Figura 1. Efecto de los consorcios nativos y un inóculo comercial de hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en la promoción del crecimiento de plantas de *Agave cupreata* a los siete meses después de la inoculación. A) Vista del crecimiento de los agaves micorrizados y testigo sin inoculación de HMA; B, C, D y E) Vista del crecimiento de las raíces; F, G y H) Observaciones de la tinción de raíces de *Agave cupreata* con azul de tripano, se muestra la colonización intraradical de los HMA; Barra de A-E= 5 cm; Barra de F-H= 50 μ m; T: Testigo; EH: El Huizachal; MI: Micorriza INIFAP®; AD: Agua Dulce; PA: Paso Ancho; CM: Cerro del Metate.

Figure 1. Effect of native consortia and a commercial arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculant on the enhancement of plant growth of *Agave cupreata* seven months after inoculation. A) View of the growth of mycorrhized agaves and control without AMF inoculation; B, C, D, and E) View of root growth; F, G y H) Observations of the trypan blue staining of *Agave cupreata* roots, intraradical coloring of the AMF is shown; Bar A-E= 5 cm; Bar F-H= 50 μ m; T: Control; EH: El Huizachal; MI: Micorriza INIFAP®; AD: Agua Dulce; PA: Paso Ancho; CM: Cerro del Metate.

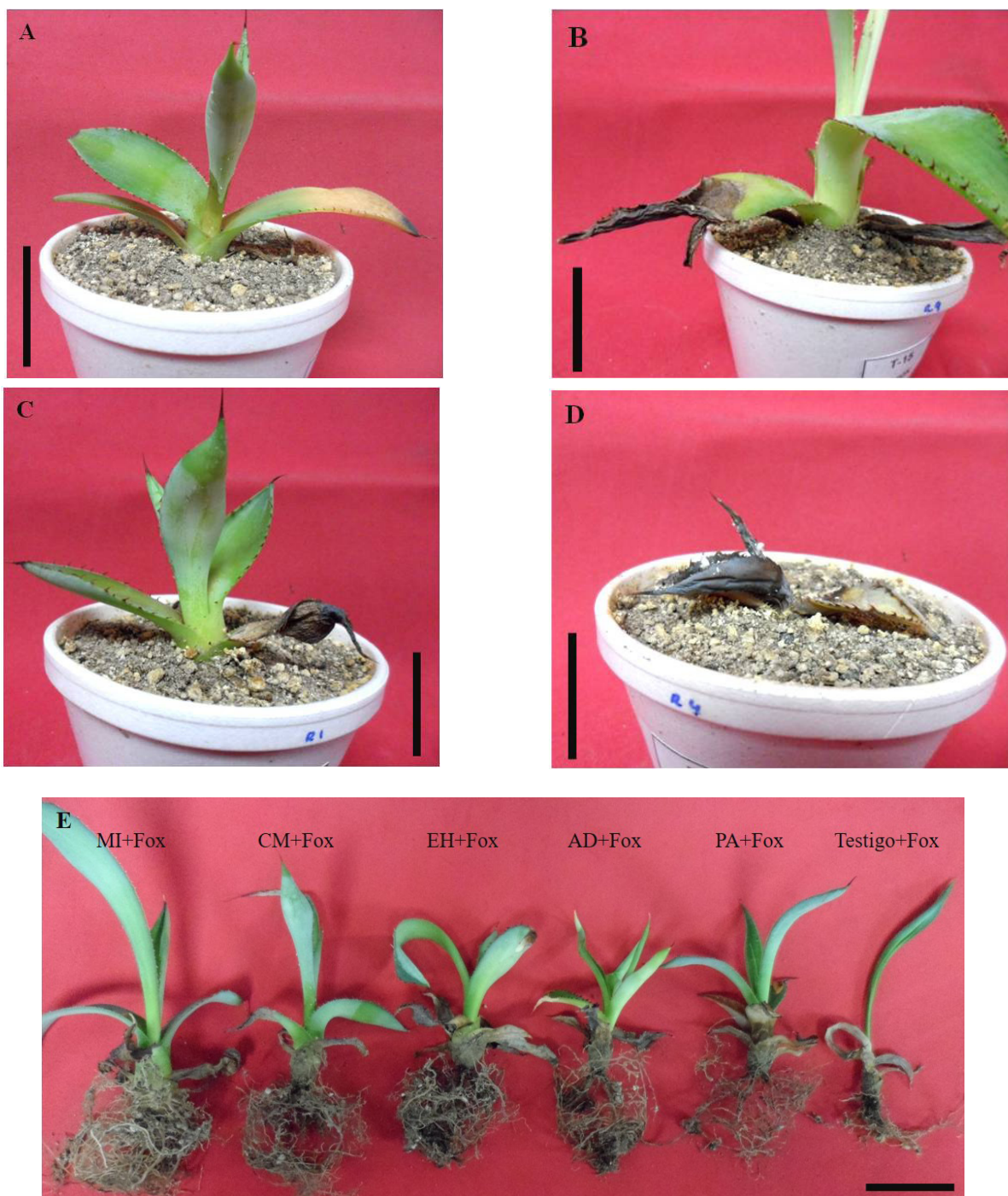


Figura 2. Presencia de síntomas asociados a la marchitez provocado por *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) en plantas de *Agave cupreata*. A) Hoja con clorosis; B y C) Hojas con enrollamiento y necrosis; D) Planta con marchitez severa; E) Vista del marchitamiento de las raíces a los 240 días después de la inoculación de Fox; Barra= 5 cm.

Figure 2. Presence of symptoms related to wilting caused by *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) in *Agave cupreata* plants. A) Leaf with chlorosis; B and C) Leaves curled and with necrosis; D) Plant with severe wilting; E) View of root wilting 240 days after inoculation with Fox; Bar= 5 cm.

promedio 74 % de daño en las plantas (SE de 3.9, hojas inferiores muertas y algunas hojas superiores amarillas). Los tratamientos con los consorcios EH, CM y AD no mostraron tener un efecto en el biocontrol de *F. oxysporum* FPC (Figura 3).

DISCUSIÓN

La inoculación con los consorcios de HMA nativos y el inóculo MI promovieron significativamente el crecimiento de las plantas de *A. cupreata*, sin embargo, la respuesta a la inoculación con HMA en otras especies de agave ha sido variable. Para *A. tequilana*, Ruiz *et al.* (2011) encontraron que plantas *in vitro* inoculadas con *R. intraradices* no mostraron diferencias significativas en las variables evaluadas como el número de hojas, altura de planta, peso fresco y seco con respecto al control no inoculado, 263 días después de la inoculación. Pimentía-Barrios *et al.* (2009) tampoco encontraron diferencias significativas en el crecimiento de plantas de *A. tequilana* inoculadas con *R. intraradices* o *R. fasciculatus* con respecto a las plantas no inoculadas con HMA. En contraste, Robles-Martínez *et al.* (2013) encontraron diferencias significativas con respecto a las plantas sin HMA para el peso seco del follaje de plantas de *A. angustifolia* inoculadas con *R. intraradices* o con al menos un consorcio nativo, a los 98 días después de la inoculación. Esta variabilidad en la respuesta de crecimiento de las plantas de agave asociadas con HMA puede deberse a varios factores como las especies de HMA (consorcios nativos o cultivos monoespecie), la complementariedad funcional o sinergismo de los HMA y a la respuesta de cada hospedero (alta o baja dependencia a los HMA) (Gustafson y Casper, 2006; Jansa *et al.*, 2008; Camprubi *et al.*, 2011). La capacidad y la eficiencia de los HMA para absorber P varían entre diferentes especies (variación

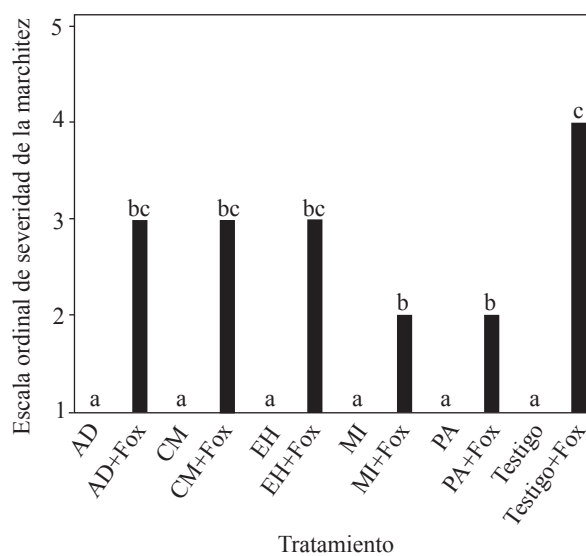


Figura 3. Severidad de la marchitez en plantas de *Agave cupreata* inoculadas con *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) a los 240 días después de la inoculación. Letras distintas indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, $p \leq 0.05$) e intervalos de confianza (95 %) de la mediana. Hongos micorrizicos arbusculares (HMA): EH: El Huizachal; MI: Micorriza INIFAP®; AD: Agua Dulce; PA: Paso Ancho; CM: Cerro del Metate; Testigo: sin HMA.

Figure 3. Severity of wilting in *Agave cupreata* plants inoculated with *Fusarium oxysporum* FPC (Fox) 240 days after inoculation. Different letters indicate significant differences (Kruskal-Wallis, $p \leq 0.05$) and confidence intervals (95 %) of the median. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF): EH: El Huizachal; MI: Micorriza INIFAP®; AD: Agua Dulce; PA: Paso Ancho; CM: Cerro del Metate; Control: without AMF.

varies between species (interspecific variation) and between isolates of the same species (intraspecific variation), even with the same host plant species (Pearson and Jakobsen, 1993; Munkvold *et al.*, 2004; Abdel-Fattah and Asrar, 2012). Consortia EH and AD that displayed a positive significant effect on the growth of *A. cupreata* contained the same five species of AMF (*A. morrowiae*, *A. spinosa*, *C. etunicatum*, *F. geosporum* and *F. mosseae*), plus two species (*A. scrobiculata* and *R. clarus*)

interespecífica) y entre cepas de la misma especie (variación intraespecífica) aún con la misma especie vegetal hospedera (Pearson y Jakobsen, 1993; Munkvold *et al.*, 2004; Abdel-Fattah y Asrar, 2012). Los consorcios EH y AD que mostraron un efecto positivo significativo en el crecimiento de *A. cupreata* contuvieron las mismas cinco especies de HMA (*A. morrowiae*, *A. spinosa*, *C. etunicatum*, *F. geosporum* y *F. mosseae*), más dos especies (*A. scrobiculata* y *R. clarus*) sólo presentes en el consorcio AD. De estas especies, *F. mosseae* (George *et al.*, 1992; Ozgonen y Erkilic, 2007) y *A. scrobiculata* (Shukla *et al.*, 2012) se han reportado como eficientes para la adquisición de P; mientras que *F. geosporum* se ha encontrado que produce respuestas diferenciales en el hospedero de acuerdo con el origen del aislado (Oliveira *et al.*, 2010).

Por otra parte, se demuestra parcialmente lo encontrado por otros autores, es decir, que la micorrización influye en la disminución de la severidad de la enfermedad (Akhtar *et al.*, 2011), aunque de manera diferencial. Sólo uno de los consorcios nativos (PA) y el inóculo comercial (MI) mostraron un efecto en la disminución de la severidad de la marchitez causada por la cepa FPC de *F. oxysporum*. El consorcio PA contuvo cuatro especies de HMA (*A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *C. claroideum* y *C. etunicatum*). De estas especies, se sabe que *C. claroideum* en combinación con otras especies de HMA (*F. geosporum*, *F. mosseae* y *R. intraradices*) inducen el biocontrol de *Pythium ultimum* (Del Fabbro y Prati, 2014). Efectos de biocontrol como resultado de la micorrización fueron encontrados por Fierro-Coronado *et al.* (2013) quienes mostraron que la micorrización de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con *R. intraradices* crecidas con una concentración baja en P (20 µM) disminuyó significativamente el índice de pudrición radical causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con respecto a las plantas no micorri-

only present in the consortium AD. Out of these species, *F. mosseae* (George *et al.*, 1992; Ozgonen and Erkilic, 2007) and *A. scrobiculata* (Shukla *et al.*, 2012) have been reported as efficient for the acquisition of P; whereas *F. geosporum* has been known to produce differential responses in the host depending on the origin of the isolate (Oliveira *et al.*, 2010).

On the other hand, there is partial proof of findings by other authors, that is, that mycorrhization influences the reduction in the disease severity (Akhtar *et al.*, 2011), although differentially. Only one of the native consortia (PA) and the commercial inoculant (MI) displayed an effect in the reduction in the severity of wilting caused by the isolate FPC of *F. oxysporum*. Consortium PA contained four AMF species (*A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *C. claroideum* and *C. etunicatum*). Out of these species, it is known that *C. claroideum* in combination with other AMF species (*F. geosporum*, *F. mosseae*, and *R. intraradices*) induce the biocontrol of *Pythium ultimum* (Del Fabbro and Prati, 2014). Effects of biocontrol as a result of mycorrhization were found by Fierro-Coronado *et al.* (2013), who proved that mycorrhization in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) with *R. intraradices* grown with a low P concentration (20 µM) reduced significantly the rotting in roots caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in regard to non-mycorrhized plants; Gardezi *et al.* (2001) evaluated the effect of a native consortium (*Glomus* sp. Zac-19) and *Glomus aggregatum* individually in the biocontrol of *Fusarium* sp. in gladiola plants (*Gladiolus grandiflorus* Andrews) and found that the AMFs reduced root rotting significantly in comparison to plants without inoculation; meanwhile, Hernández-Montiel *et al.* (2013) found that the inoculation of papaya plants (*Carica papaya* L.) with a MTZ01 native consortium (*R. intraradices*, *F. mosseae*, *C. etunicatum* and *Gigaspora albida*) reduced

zadas; Gardezi *et al.* (2001) evaluaron el efecto de un consorcio nativo (*Glomus* sp. Zac-19) y *Glomus aggregatum* de manera individual en el biocontrol de *Fusarium* sp. en plantas de gladiola (*Gladiolus grandiflorus* Andrews) encontrando que los HMA disminuyeron significativamente la pudrición radical con respecto a las plantas sin inocular; mientras que Hernández-Montiel *et al.* (2013) encontraron que la inoculación de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) con un consorcio nativo MTZ01 (*R. intraradices*, *F. mosseae*, *C. etunicatum* y *Gigaspora albida*) disminuyeron significativamente el índice de la severidad de la enfermedad en 56 % y la colonización radical de *F. oxysporum* en 54 % con respecto al control. Los HMA juegan un papel importante en el control de diversos fitopatógenos a través de mecanismos directos o indirectos (Jung *et al.*, 2012). Mecanismos directos como la competencia por sitios de colonización (Cordier *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2012; Hernández-Montiel *et al.*, 2013; Reyes-Tena *et al.*, 2016), cambios en la composición de exudados radicales (Scheffknecht *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2015) e indirectos como la resistencia inducida por la micorrización de los diferentes mecanismos de defensa vegetal (Jung *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2013). Jaiti *et al.* (2007) encontraron que plantas de palma datilera (*Phoenix dactylifera*) inoculadas con un consorcio nativo (*Glomus* sp., *Sclerocystis* sp., *Acaulospora* sp. y *Scutellospora* sp.) indujo cambios en las actividades de dos enzimas relacionadas con la defensa vegetal (peroxidasa y polifenoloxidasas) sólo cuando fueron confrontadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Estos mecanismos pueden estar implicados en la disminución de la severidad de la marchitez en los tratamientos PA+Fox y MI+Fox. La aparición de los síntomas de la marchitez originados por el patógeno inoculado en las plantas de *A. cupreata* fue de manera lenta y diferencial pero progresiva, similar a lo reportado por Ávila-

significantly the rate of disease severity by 56 %, and root colonization with *F. oxysporum* by 54 % in regard to the control. AMFs play an important role in the control of several plant pathogens through direct or indirect mechanisms (Jung *et al.*, 2012). Direct mechanisms include the competition for colonization sites (Cordier *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2012; Hernández-Montiel *et al.*, 2013; Reyes-Tena *et al.*, 2016), changes in the composition of root exudates (Scheffknecht *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2015), and indirect mechanisms include the resistance induced by mycorrhization of the different plant defense mechanisms (Jung *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2013). Jaiti *et al.* (2007) found that date palm plants (*Phoenix dactylifera*) inoculated with a native consortium (*Glomus* sp., *Sclerocystis* sp., *Acaulospora* sp. and *Scutellospora* sp.) induced changes in the activities of two enzymes related to plant defense (peroxidase and polyphenol oxidase) only when confronted with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. These mechanisms may be implied in the reduction of the severity of wilting in treatments PA+Fox and MI+Fox. The appearance of symptoms of wilting caused by the pathogen inoculated in the *A. cupreata* plants appeared in a slow and differential but progressive manner, similar to reports by Ávila-Miranda *et al.* (2010), who inoculated *A. tequilana* plants with two *F. oxysporum* isolates to evaluate their pathogenicity and found the initial symptoms of the disease in the tips of leaves (chlorosis, curling, and wilting) 200 days after inoculation.

CONCLUSIONS

The native AMF consortia and the commercial inoculant INIFAP[®] mycorrhiza displayed a significant effect on the growth of *A. cupreata* plants under greenhouse conditions seven months

Miranda *et al.* (2010) quienes al inocular plantas de *A. tequilana* con dos cepas de *F. oxysporum* para evaluar su patogenicidad observaron los síntomas iniciales de la enfermedad en las puntas de las hojas (clorosis, enrollamiento y marchitez) a los 200 días después de la inoculación.

CONCLUSIONES

Los consorcios nativos de HMA y el inóculo comercial micorriza INIFAP® mostraron un efecto significativo en el crecimiento de plantas de *A. cupreata* en condiciones de invernadero a los siete meses después de la inoculación, por lo que pueden considerarse como potenciales biofertilizantes para *A. cupreata* en la etapa de vivero. Se encontró un efecto de biocontrol de dos inóculos, el consorcio nativo Paso Ancho (PA) y el inóculo comercial micorriza INIFAP® al disminuir en 41 % la severidad de la marchitez en las plantas de *A. cupreata* inoculadas con *F. oxysporum* FPC, ambos inóculos pueden ser considerados como posibles agentes de biocontrol. Este es el primer reporte del uso de HMA para la promoción del crecimiento vegetal y en el biocontrol de *F. oxysporum* en *A. cupreata*.

AGRADECIMIENTOS

J. R. Trinidad-Cruz agradece al CONACYT por el apoyo de beca para realizar sus estudios de maestría desarrollada como parte del proyecto MICH-2010-03-148208 financiado por el Fondo Mixto del gobierno del estado de Michoacán y el CONACYT. La Dra. E. Quiñones-Aguilar participó como codirectora de tesis de maestría de J. R. Trinidad-Cruz. Se agradece al Dr. Joaquín Qui-Zapata del CIATEJ por proporcionar al hongo fitopatógeno *F. oxysporum* FPC para este estudio.

after inoculation, and can therefore be considered potential biofertilizers for *A. cupreata* in the greenhouse phase. A biocontrol effect was found in two inoculants: the native consortium Paso Ancho (PA) and the commercial inoculant INIFAP® mycorrhiza, which reduced by 41% the severity of wilting in *A. cupreata* plants inoculated with *F. oxysporum* FPC; both inoculants can be considered possible biocontrol agents. This is the first report on the use of AMF to promote plant growth and in the biocontrol of *F. oxysporum* in *A. cupreata*.

ACKNOWLEDGEMENTS

J. R. Trinidad-Cruz thanks CONACYT for the scholarship support granted to carry out his Master's degree studies as a part of the project MICH-2010-03-148208 financed by the Fondo Mixto of the Michoacán state government and CONACYT. Dr. E. Quiñones-Aguilar participated as a codirector of J. R. Trinidad-Cruz's Master's degree thesis. Thanks to Dr. Joaquín Qui-Zapata from CIATEJ for providing the *F. oxysporum* FPC fungus for this study.

~~~~~End of the English version~~~~~

## LITERATURA CITADA

- Abdel-Fattah GM and Asrar AWA. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungal application to improve growth and tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown in saline soil. *Acta Physiologiae Plantarum* 34:267-277. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-011-0825-6>
- Aguirre-Dugua X and Eguiarte LE. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments* 90:36-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Akhtar MS and Siddiqui ZA. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. Pp:61-97. In: Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (eds.). *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry*. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands. 359p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7_3)

- Akhtar MS, Siddipqui ZA and Wiemken A. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* to control plant fungal diseases. Pp:263-292. In: Lichtfouse E (ed.). Alternative farming systems, biotechnology, drought stress and ecological fertilization. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands. 354p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0186-1\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0186-1_9)
- Ávila-Miranda ME, López-Zazueta JG, Arias-Castro C, Rodríguez-Mendiola MA, Guzmán-de Peña DA, Vera-Núñez JA and Peña-Cabriales JJ. 2010. Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul). Journal of the Professional Association for Cactus Development 12:166-180. Disponible en línea: [http://www.jpacd.org/downloads/Vol12/13\\_JJPenaJPACD12.pdf](http://www.jpacd.org/downloads/Vol12/13_JJPenaJPACD12.pdf)
- Bernal-Alcocer A, Zamora-Natera JF, Virgen-Calleros G y Nuño-Romero R. 2005. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 23:140-146. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223205.pdf>
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T and Malajczuc N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32. Canberra, Australia. 155 p.
- Cameron DD, Neal AL, van Wees SCM and Ton J. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts?. Cell Press 18:539-545. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.004>
- Camprubi A, Estaun V and Calvet C. 2011. Greenhouse inoculation of psammophilic plant species with arbuscular mycorrhiza fungi to improve survival and early growth. European Journal of Soil Biology 47:194-197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.02.001>
- Cui M and Nobel PS. 1992. Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. New Phytologist 122:643-649. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb00092.x>
- Cordier C, Pozo JM, Barea JM, Gianinazzi S and Gianinazzi-Pearson V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. Molecular Plant-Microbe Interactions 11:1017-1028. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.10.1017>
- De Cal A, Garcia-Lepe R and Melgarejo P. 2000. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Histological studies of infected and induced tomato stems. Phytopathology 90:260-268. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.3.260>
- Del Fabbro C and Prati D. 2014. Early responses of wild plant seedlings to arbuscular mycorrhizal fungi and pathogens. Basic and Applied Ecology 15:534-542. <http://dx.doi.org/10.1016/j.baae.2014.08.004>
- Eilenberg J. 2006. Concepts and visions of biological control. Pp:1-11. In: Eilenberg J and Hokkanen HMT (eds.). An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Vol. 2. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands. 322 p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-4401-4>
- Fierro-Coronado RA, Castro-Moreno MG, Ruelas-Ayala RD, Apodaca-Sánchez MA and Maldonado-Mendoza IE. 2013. Induced protection by *Rhizophagus intraradices* against *Fusarium* wilt of tomato. Interciencia 38:48-53. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33926506008>
- Gardezi AK, Cetina VM, Ferrera-Cerrato R, Velázquez J, Pérez CA y Larqué M. 2001. Hongos micorrízicos arbusculares como componente de control biológico de la pudrición causada por *Fusarium* sp. en gladiola. Terra Latinoamericana 19:259-264. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57319307>
- George E, Haussler KU, Vetterlein D, Gorgus E and Marschner H. 1992. Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. Canadian Journal of Botany 70:2130-2137. <http://dx.doi.org/10.1139/b92-265>
- Gerdemann JW and Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46:235-244. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- Gobierno de Michoacán. 2012. Establece Fausto Vallejo corredor geográfico del mezcal en Michoacán. <http://michoacan.gob.mx/index.php/noticias/1076-elevacion-mezcal>. (consulta, marzo 2014).
- Gustafson JD and Casper BB. 2006. Differential host plant performance as a function of soil arbuscular mycorrhizal fungal: Experimentally manipulating co-occurring *Glomus* species. Plant Ecology 183:257-263. <http://dx.doi.org/10.1007/s11258-005-9037-8>
- Hage-Ahmed K, Krammer J and Steinkellner S. 2013. The intercropping partner affects arbuscular mycorrhizal fungi and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* interactions in tomato. Mycorrhiza 23:543-550. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-013-0495-x>
- Hernández-Montiel LG, Rueda-Puente EO, Cordoba-Matson MV, Holguín-Peña JR and Zulueta-Rodríguez R. 2013. Mutualistic interaction of rizobacteria with arbuscular mycorrhizal fungi and its antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* in *Carica papaya* seedlings. Crop Protection 47:61-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.01.008>
- Hu JL, Lin XG, Wang JH, Shen WS, Wu S, Peng SP and Mao TT. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation enhances suppression of cucumber *Fusarium* wilt in greenhouse soils. Pedosphere 20:586-593. [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(10\)60048-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(10)60048-3)
- Jaiti F, Meddipch A and Hadrami IE. 2007. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. Physiological and Molecular Plant Pathology 71:166-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.01.002>
- Jansa J, Smith FA and Smith SE. 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi?. New Phytologist 177:779-789. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x>
- Jarstfer AG and Sylvia DM. 1992. The production and use of aeroponically grown inocula of VAM fungi in the native plant nursery. Florida Agricultural Experiment Station Journal Series No. R-02398. Florida, US. 11 p.
- Jung SC, Martínez-Medina A, López-Raéz JA and Pozo MJ. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. Journal of Chemical Ecology 38:651-664. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>
- Larsen J, Graham JH, Cubero J and Ravnskov S. 2012. Biocontrol traits of plant growth suppressive arbuscular mycorrhizal

- fungi against root rot in tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. European Journal of Plant Pathology 133:361-369. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-011-9909-9>
- Martínez-Palacios A, Gómez-Sierra JM, Sáenz-Romero C, Pérez-Nasser N and Sánchez-Vargas N. 2011. Genetic diversity of *Agave cupreata* Trel. & Berger. considerations for its conservation. Revista Fitotecnia Mexicana 34:159-165. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v34n3/v34n3a6.pdf>
- Munkvold L, Kjølner R, Vestberg M, Rosendahl S and Jakobsen I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 164:357-364. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x>
- Oliveira RS, Boyer LR, de Carvahlo MF, Jeffries P, Vosatka M, Castro PML and Dodd CD. 2010. Genetic, phenotypic and functional variation within a *Glomus geosporum* isolate cultivated with or without the stress of a highly alkaline anthropogenic sediment. Applied Soil Ecology 45:39-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.01.008>
- Ozgonen H and Erkilic A. 2007. Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. Crop Protection 26:1682-1688. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2007.02.010>
- Pearson JN and Jakobsen I. 1993. The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labeling with <sup>32</sup>P and <sup>33</sup>P. New Phytologist 124:489-494. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03840.x>
- Pimienta-Barrios E, Zañudo-Hernández J y López-Alcocer E. 2009. Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. Acta Botánica Mexicana 89:63-78. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/abm/n89/n89a5.pdf>
- Phillips JM and Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-161. Disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153670801103>
- Qui-Zapata J, Rincón-Enríquez G, Rodríguez-Domínguez JM, Gutiérrez-Mora A, Dupré P y García-Vera AG. 2011. Pathogenicity tests *in vitro* and *in planta* of pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* associated with agave wilt. In: First International Symposium on Agave. CIATEJ-UNAM, August 29 to September 2, 2011. Guadalajara, Jalisco, México.
- Ren L, Zhang N, Wu P, Huo H, Xu G and Wu G. 2015. Arbuscular mycorrhizal colonization alleviates *Fusarium* wilt in watermelon and modulates the composition of root exudates. Plant Growth Regulation 77:77-85. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-015-0038-x>
- Reyes-Tena A, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G y López-Pérez L. 2016. Micorrización en *Capsicum annum* L. para la promoción de crecimiento y bioprotección contra *Phytophthora capsici* L. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7:857-870. Disponible en línea: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/es/282-rss/3938-micorrizacion-en-capsicum-annuum-l-para-promocion-de-crecimiento-y-bioproteccion-contra-phytophthora-capsici-l>
- Robles-Martínez ML, Robles C, Rivera-Becerril F, Ortega-Larrocea MP y Pliego-Marín L. 2013. Inoculación con consorcios nativos de hongos de micorriza arbuscular en *Agave angustifolia* Haw. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6:1231-1240. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/2631/263128353014.pdf>
- Ruiz S, Adriano L, Ovando I, Navarro C and Salvador M. 2011. Biofertilization of micropropagated *Agave tequilana*: Effect on plant growth and production of hydrolytic enzymes. African Journal of Biotechnology 10:9623-9630. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.641>
- Saldajeno MGB, Chandanie WA, Kubota M and Hyakumachi M. 2008. Effects of interactions of arbuscular mycorrhizal fungi and beneficial saprophytic mycoflora on plant growth and disease protection. Pp:211-226. In: Siddipqui ZA, Akhtar MS and Futai K (eds.). Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry. Springer Netherlands, Dordrecht, Netherlands. 349p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7_9)
- Scheffknecht S, Mamerler R, Steinkellner S and Vierheilig H. 2006. Root exudates of mycorrhizal tomato plants exhibit a different effect on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* than root exudates from non-mycorrhizal tomato plants. Mycorrhiza 16:365-370. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-006-0048-7>
- Shukla A, Kumar A, Jha A and Rao DVKN. 2012. Phosphorus threshold for arbuscular mycorrhizal colonization of crops and tree seedlings. Biology and Fertility of Soils 48:109-116. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-011-0576-y>
- Smith SE and Read DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Third edition. Academic Press. Cambridge, UK. 800p.
- StatPoint Inc. 2005. StatGraphics Centurion XV version 15.02.06. Warrenton, Virginia, USA. [www.statgraphics.com](http://www.statgraphics.com).
- Trinidad-Cruz JR, Quiñones-Aguilar EE, Qui-Zapata JA, Rodríguez-Domínguez JM, López-Pérez L y Rincón-Enríquez G. 2013. Patogenicidad de *Fusarium oxysporum* en *Agave cupreata*. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (suplemento):S90. Disponible en línea: <http://rnf.smf.org.mx/suplemento/docs/suplemento.pdf>
- Tripathi S, Kamal S, Sheramati I, Oelmüller R and Varma A. 2008. Mycorrhizal fungi and other root endophytes as bio-control agents against root pathogens. Pp:281-306. In: Varma A (ed.). Mycorrhiza. Springer Berlin Heidelberg. Heidelberg, Germany. 797p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3\\_14](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_14)
- Vega-Ramos KL, Uvalle-Bueno JX and Gómez-Leyva JF. 2013. Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. Biochemical Genetics 51:243-255. <http://dx.doi.org/10.1007/s10528-012-9559-4>