

Growth of 'Sweet Nufar' basil (*Ocimum basilicum* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum brasilense*

Crecimiento de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) 'Sweet Nufar' inoculada con hongos micorrícicos arbusculares y *Azospirillum brasilense*

Homero González-Gómez¹; Porfirio Juárez-López^{1*}; Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar²; Gabriel Rincón-Enríquez; Irán Alia-Tejagal¹; José Augusto Ramírez-Trujillo³; Víctor López-Martínez¹; Oscar Gabriel Villegas-Torres¹; Cid Aguilar-Carpio⁴

¹Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Av. Universidad, núm. 1001, Cuernavaca, Morelos, C. P. 62210, México.

²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Camino el Arenero, núm. 1227, Zapopan, Jalisco, C. P. 45019, México.

³Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigación en Biotecnología. Av. Universidad, núm. 1001, Cuernavaca, Morelos, C. P. 62210, México.

⁴Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado de Botánica. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México, C. P. 56230, México.

*Corresponding author: porfirio.juarez@uaem.mx, tel: 777 103 34 26.

Abstract

The use of beneficial microorganisms in agriculture can increase the productivity of agricultural crops; however, there are few studies that consider aromatic plants, such as basil (*Ocimum basilicum* L.). The aim of this study was to evaluate the growth of 'Sweet Nufar' basil inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and *Azospirillum brasilense*. The treatments tested were: 1) without microorganisms (control), 2) *Rizhophagus intraradices*, 3) *Funneliformis mosseae*, 4) AMF consortium, 5) *Azospirillum brasilense*, 6) *R. intraradices* + *A. brasilense* and 7) without microorganisms and irrigated with 100 % Steiner's nutrient solution. Treatments 1 to 6 were irrigated with the same nutrient solution, but at 50 %. Fifty days after transplanting, growth variables, mineral concentration, colonization percentage and number of AMF spores were recorded. The AMF and *A. brasilense* bacterium increased the fresh biomass weight and leaf area of 'Nufar' basil, which was associated with the highest concentration of nitrogen and potassium in the plant tissue. This implies that the microorganisms evaluated increase the development and growth of basil grown with reduced levels of mineral nutrition, which represents a sustainable alternative in the agronomic management of this crop under greenhouse conditions.

Keywords: arbuscular mycorrhizal fungi, growth-promoting bacteria, crop nutrition, inert substrate.

Resumen

El uso de microorganismos benéficos en la agricultura puede incrementar la productividad de los cultivos agrícolas; sin embargo, existen pocos estudios que consideren a las plantas aromáticas, como la albahaca (*Ocimum basilicum* L.). El objetivo del presente estudio fue evaluar el crecimiento de albahaca 'Sweet Nufar' inoculada con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y *Azospirillum brasilense*. Los tratamientos ensayados fueron: 1) sin microorganismos (testigo), 2) *Rizhophagus intraradices*, 3) *Funneliformis mosseae*, 4) consorcio de HMA, 5) *Azospirillum brasilense*, 6) *R. intraradices* + *A. brasilense* y 7) sin microorganismos e irrigados con solución nutritiva de Steiner al 100 %. Los tratamientos del 1 al 6 se irrigaron con la misma solución nutritiva, pero al 50 %. Cincuenta días después del trasplante se midieron variables de crecimiento, concentración mineral, porcentaje de colonización y número de esporas de HMA. Los HMA y la bacteria *A. brasilense* incrementaron el peso de biomasa fresca y el área foliar de albahaca 'Nufar', lo cual se asoció con la mayor concentración de nitrógeno y potasio en el tejido vegetal. Lo anterior implica que los microorganismos evaluados aumentan el desarrollo y el crecimiento de albahaca cultivada con niveles de nutrición mineral reducido, lo que representa una alternativa sustentable en el manejo agronómico de dicho cultivo en condiciones de invernadero.

Palabras clave: hongos micorrícicos arbusculares, bacterias promotoras de crecimiento, nutrición de cultivos, sustrato inerte.

Please cite this article as follows (APA 6): González-Gómez, H., Juárez-López, P., Quiñones-Aguilar, E. E., Rincón-Enríquez, G., Alia-Tejagal, I., Ramírez-Trujillo, J. A., López-Martínez, V., Villegas-Torres, O. G., & Aguilar-Carpio, C. (2023). Growth of 'Sweet Nufar' basil (*Ocimum basilicum* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum brasilense*. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 29(1), 39-52. doi: 10.5154/r.rchsh.2022.03.005



Revista Chapingo
Serie Horticultura

Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are cosmopolitan rhizospheric microorganisms found in up to 80 % of terrestrial plant species. The main characteristic of this fungus is the ability to colonize the root system of plants and establish a mutualistic or symbiotic association (Brundrett & Tedersoo, 2018). The term arbuscular refers to fungal structures called arbuscules that form within plant root cells; therefore, an arbuscular mycorrhiza is defined as a mutualistic symbiosis with the ability to produce arbuscules within the cells of compatible plants (Köhl, Lukasiewicz, & van der Heijden, 2016).

Arbuscular mycorrhiza are endomycorrhiza whose hyphae initially enter the root cells and later penetrate inside them, forming feeding vesicles and arbuscules. An arbuscular mycorrhiza has three main components: the root, structures within the root cells, and extraradical mycelium in the soil (Smith & Smith, 2011). The symbiotic relationship occurs when the plant receives nutrients and water from the mycorrhiza (Camarena-Gutiérrez, 2012), and the fungus obtains carbohydrates and vitamins from the plant that it is unable to synthesize on its own (Thioub, Ewusi-Mensah, Sarkodie-Addo, & Adjei-Gyapong, 2019). Other important benefits received by the plant from said symbiosis are growth promotion, increased mineral uptake (Díaz-Hernández, Aguirre-Medina, & Díaz-Fuentes, 2018) and tolerance to soil pathogens (Tahat, Kamaruzaman, & Othman, 2010).

Some types of AMF have been identified such as *Funnelformis mosseae*, whose mycelium modifies root anatomy (such as their length, volume, and exploration area), which makes inoculated plants more efficient in absorbing soil nutrients such as nitrates (Huang et al., 2019). Likewise, fungi increase the uptake of poorly mobile or immobile mineral ions from the soil and their hyphae, by growing beyond the rhizosphere and thus increasing the absorbent surface area of roots. In general, this behavior is attributed to AMF (Vallejos-Torres, Saboya-Pisco, & Arévalo-López, 2021).

Plant growth-promoting bacteria (PGPR) are a group of microorganisms that can increase crop growth and productivity. *Azospirillum* is one of the best-known genera used in agriculture to benefit plant development through the production of phytohormones (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012) and changes in plant growth by increasing germination speed, biomass accumulation (aerial and root), root respiration rate, and root system development of root hairs and root diameter) (Canto-Martín, Medina-Peralta, & Morales-Avelino, 2004).

Positive effects have been reported with the use of AMF or beneficial rhizobacteria on the growth and yield of fruiting vegetables (Chiquito-Contreras, Reyes-Pérez,

Introducción

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son microorganismos rizosféricos cosmopolitas que se encuentran en hasta 80 % de las especies vegetales terrestres. La característica principal de dicho hongo es la capacidad de colonizar el sistema radical de las plantas y establecer una asociación mutualista o de simbiosis (Brundrett & Tedersoo, 2018). El término arbuscular se refiere a las estructuras fúngicas denominadas arbuscúlos que se forman dentro de las células de las raíces de las plantas; por consiguiente, una micorriza arbuscular se define como una simbiosis mutualista con capacidad para producir arbuscúlos dentro de las células de plantas compatibles (Köhl, Lukasiewicz, & van der Heijden, 2016).

Las micorrizas arbusculares son endomicorrizas, cuyas hifas se introducen, inicialmente, en las células de la raíz y, posteriormente, penetran al interior de ellas, formando vesículas alimenticias y arbuscúlos. Una micorriza arbuscular tiene tres componentes principales: la raíz, las estructuras dentro de las células de la raíz y el micelio extraradical en el suelo (Smith & Smith, 2011). La relación de simbiosis ocurre cuando la planta recibe nutrientes y agua de la micorriza (Camarena-Gutiérrez, 2012), y el hongo obtiene de la planta carbohidratos y vitaminas que es incapaz de sintetizar por sí mismo (Thioub, Ewusi-Mensah, Sarkodie-Addo, & Adjei-Gyapong, 2019). Otros beneficios importantes que recibe la planta de dicha simbiosis son la promoción del crecimiento, la mayor absorción de minerales (Díaz-Hernández, Aguirre-Medina, & Díaz-Fuentes, 2018) y la tolerancia a patógenos del suelo (Tahat, Kamaruzaman, & Othman, 2010).

Se han identificado algunos tipos de HMA como *Funnelformis mosseae*, cuyo micelio modifica la anatomía de las raíces (como su longitud, volumen y área de exploración), lo cual hace a las plantas inoculadas más eficaces en la absorción de nutrientes del suelo, como los nitratos (Huang et al., 2019). Asimismo, los hongos incrementan la absorción de iones minerales poco móviles o inmóviles del suelo y sus hifas, al crecer más allá de la rizosfera, incrementan la superficie absorbente de las raíces. En general, este comportamiento se atribuye a los HMA (Vallejos-Torres, Saboya-Pisco, & Arévalo-López, 2021).

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) son un grupo de microorganismos que pueden incrementar el crecimiento y la productividad de cultivos. *Azospirillum* es uno de los géneros más conocidos y utilizados en la agricultura para beneficiar el desarrollo de las plantas mediante la producción de fitohormonas (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012) y cambios en el crecimiento vegetal al incrementar la velocidad de germinación,

Chiquito-Contreras, Vidal-Hernández, & Hernández-Montiel, 2020; Zulueta-Rodríguez, Hernández-Montiel, Reyes-Pérez, González-Morales, & Lara-Capistrán, 2020). However, research evaluating the interaction between AMF and *A. brasilense* in albahaca (*Ocimum basilicum*) is scarce. It is known that the interaction between different microorganisms can improve the uptake of nutrients such as nitrogen and phosphorus, elements of great importance for plant growth and development (García-Gutiérrez et al., 2012).

Basil is a commercially important aromatic plant used as food, as well as in the cosmetic and pharmaceutical industry (Juárez-Rosete et al., 2013). In Mexico, fresh basil is generally destined for the export market. In 2019, fresh basil was generally destined for the export market. In 2019, 3,103.4 t were produced, which generated a value of almost 50 million Mexican pesos.

Based on the above, the aim of this study was to evaluate the growth and development of basil inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and *A. brasilense* under limited nutrition.

Materials and methods

Experiment location

The experiment was carried out in a tunnel-type greenhouse with a white plastic cover, which provided 30 % shading, and with an anti-aphid mesh on the side walls, belonging to the Faculty of Agricultural Sciences of the Autonomous University of the State of Morelos, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, Mexico (18° 58' 51" NL and 99° 13' 55" WL, at 1,866 m a. s. l.). Environmental conditions in the greenhouse were monitored with a model U12 datalogger (Hobo®, Massachusetts, USA): average temperature of 25 °C, average relative humidity of 55 % and average solar radiation of 514 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Treatments evaluated

The treatments evaluated were: 1) without microorganism inoculation (control), 2) *Rhizophagus intraradices*, 3) *Funneliformis mosseae*, 4) Cerro del Metate AMF consortium, 5) *Azospirillum brasilense*, 6) *R. intraradices* + *A. brasilense* and 7) without microorganism inoculation and irrigated with Steiner's nutrient solution at 100 % concentration.

Treatments 1 to 6 were irrigated daily by hand with 0.5 L of Steiner's nutrient solution (Steiner, 1984) at 50 % during the first 21 days after transplanting (dat), and irrigated with 1.5 L of nutrient solution during the period from 22 to 50 dat, at which time the plants were harvested. Treatment 7 was used to compare the effect of nutrient concentration and inoculations with the microorganisms on plant growth.

la acumulación de biomasa (aérea y radical), la velocidad de respiración de la raíz y el desarrollo del sistema radical (de los pelos radicales y del diámetro de la raíz) (Canto-Martín, Medina-Peralta, & Morales-Avelino, 2004).

Se han reportado efectos positivos con el uso de HMA o rizobacterias benéficas en el crecimiento y rendimiento de hortalizas de fruto (Chiquito-Contreras, Reyes-Pérez, Chiquito-Contreras, Vidal-Hernández, & Hernández-Montiel, 2020; Zulueta-Rodríguez, Hernández-Montiel, Reyes-Pérez, González-Morales, & Lara-Capistrán, 2020). Sin embargo, las investigaciones que evalúan la interacción entre HMA y *A. brasilense* en albahaca (*Ocimum basilicum*) son escasas. Se sabe que la interacción entre diferentes microorganismos puede mejorar la absorción de nutrientes como nitrógeno y fósforo, elementos de gran importancia para el crecimiento y desarrollo de la planta (García-Gutiérrez et al., 2012).

La albahaca es una planta aromática de importancia comercial usada como alimento, así como en la industria cosmética y farmacéutica (Juárez-Rosete et al., 2013). En México, la albahaca fresca se destina generalmente al mercado de exportación. En 2019 se produjeron 3,103.4 t, las cuales generaron un valor de casi 50 millones de pesos mexicanos.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el crecimiento y desarrollo de albahaca inoculada con hongos micorrícicos arbusculares y *A. brasilense* bajo nutrición limitada.

Materiales y métodos

Localización del experimento

El experimento se realizó en un invernadero tipo túnel con cubierta plástica de color blanco, que proporcionó 30 % de sombreado, y con malla antiáfidos en las paredes laterales, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México (18° 58' 51" LN y 99° 13' 55" LO, a 1,866 m s. n. m.). Las condiciones ambientales en el invernadero se monitorearon con un datalogger modelo U12 (Hobo®, Massachusetts, EUA): temperatura promedio de 25 °C, humedad relativa promedio de 55 % y una media de radiación solar de 514 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tratamientos evaluados

Los tratamientos evaluados fueron: 1) sin inocular microorganismo (testigo), 2) *Rhizophagus intraradices*, 3) *Funneliformis mosseae*, 4) consorcio de HMA Cerro del Metate, 5) *Azospirillum brasilense*, 6) *R. intraradices*

Experimental unit and design

The experimental unit was a pot containing one basil plant. A completely randomized design with six replications was used.

Microbiological plant material and sowing of basil plants

The 'Sweet Nufar' basil cultivar (SunLine AG Inc, USA) was used. Seeds were sown on March 29, 2019 in 200-cavity polystyrene trays with Sunshine® Mix 3 germination substrate, previously sterilized in an autoclave (cv 300, AESA) for 15 min at 120 °C (0.98 to 1.05 kg·cm⁻² steam pressure), according to the methodology described by Zulueta-Rodríguez et al. (2016). *Azospirillum brasilense* strain Cd was provided by the Biotechnology Center of the Autonomous University of the State of Morelos, and the AMF by the Phytopathology Laboratory of the Center for Research and Assistance in Technology and Design of the State of Jalisco (CIATEJ). The *Funneliformis mosseae* inoculum was isolated from the Cerro del Metate consortium, the *Rizhophagus intraradices* strain was isolated from the Micorriza INIFAP product, and the Cerro del Metate consortium was isolated from the Cerro del Metate mountain, located in Michoacán, from the rhizosphere of *Agave cupreata* (Trinidad-Cruz, Quiñones-Aguilar, Hernández-Cuevas, López-Pérez, & Rincón-Enríquez, 2017).

Inoculation of basil plants with arbuscular mycorrhizal fungi

Transplanting was performed on May 4, 2019 (38 days after sowing [das]). The basil seedlings were placed in 5-L plastic pots containing tezontle with granulometry ranging from 1 to 5 mm in diameter, previously autoclaved for 15 min at 120 °C (0.98 to 1.05 kg·cm⁻² steam pressure). Treatments were established at transplanting; the AMF were applied at a dose of 150 spores per plant directly to the bare root. The fungi were found in river sand as an inoculation medium.

Inoculation of basil plants with *A. brasilense*

Basil plants were inoculated with *A. brasilense* strain Cd at a concentration of 1.04×10^9 colony-forming units (CFU) per gram of dry substrate (Bashan, 1986). CFU counting was performed according to the methodology described by Peña-Cortés, Peña-Cortés, and Gonzalo-Moreno (2011). The pots had 3 kg of tezontle, and the inoculations were carried out every two weeks from May 14, 2019 until harvest at 50 dat.

Plant growth variables

Harvesting was carried out at 50 dat and the following variables were determined: plant height (PH, cm), basal stem diameter (SD, mm), fresh aerial biomass weight

+ *A. brasilense* y 7) sin inocular microorganismo e irrigado con solución nutritiva de Steiner al 100 % de concentración.

Los tratamientos del 1 al 6 se regaron diariamente de forma manual con 0.5 L de solución nutritiva de Steiner (Steiner, 1984) al 50 % durante los primeros 21 días después del transplante (ddt), y se regaron con 1.5 L de solución nutritiva durante el periodo de 22 a 50 ddt, momento en que se realizó la cosecha de plantas. El tratamiento 7 se usó para comparar el efecto de la concentración nutritiva y las inoculaciones con los microorganismos sobre el crecimiento de las plantas.

Unidad y diseño experimental

La unidad experimental fue una maceta que contenía una planta de albahaca. Se utilizó un diseño completamente al azar con seis repeticiones.

Material vegetal, microbiológico y siembra de las plantas de albahaca

Se utilizó el cultivar de albahaca 'Sweet Nufar' (SunLine AG Inc, EUA). Las semillas se sembraron el 29 de marzo de 2019 en bandejas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato de germinación Sunshine® Mix 3, previamente esterilizado en una autoclave (cv 300, AESA) durante 15 min a 120 °C (0.98 a 1.05 kg·cm⁻² de presión de vapor), de acuerdo con la metodología descrita por Zulueta-Rodríguez et al. (2016). La cepa Cd de *Azospirillum brasilense* fue proporcionada por el Centro de Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, y los HMA, por el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). El inóculo de *Funneliformis mosseae* se aisló del consorcio Cerro del Metate, la cepa de *Rizhophagus intraradices* se aisló del producto Micorriza INIFAP, y el consorcio Cerro del Metate se aisló de la montaña Cerro del Metate, ubicada en Michoacán, a partir de la rizosfera de *Agave cupreata* (Trinidad-Cruz, Quiñones-Aguilar, Hernández-Cuevas, López-Pérez, & Rincón-Enríquez, 2017).

Inoculación de las plantas de albahaca con los hongos micorrícicos arbusculares

El trasplante se realizó el 4 de mayo de 2019 (38 días después de la siembra [dds]). Las plántulas de albahaca se colocaron en macetas de plástico con capacidad de 5 L, las cuales contenían tezontle con granulometría de 1 a 5 mm de diámetro, previamente esterilizado en autoclave durante 15 min a 120 °C (0.98 a 1.05 kg·cm⁻² de presión de vapor). Los tratamientos se establecieron al momento del trasplante, los HMA se aplicaron en dosis de 150 esporas por planta directamente a la raíz

(FBW, g), dry aerial biomass weight (DBW, g) and leaf area (LA, cm²).

Decreased basil growth due to a reduction in the nutrient concentration in the nutrient solution

The percentage reduction of the characters plant height, fresh biomass weight and leaf area was determined by decreasing the concentration of the nutrient solution from 100 % (treatment 7) to 50 % (treatments 1 to 6) using the following formula:

$$\text{Decrease in plant growth} = \left(\frac{\bar{Y}_7 - Y_{ij}}{\bar{Y}_7} \right) \times 100$$

$$i = 1, 2, \dots, 6 ; \quad j = 1, 2, \dots, 6$$

where \bar{Y}_7 is the mean of treatment seven (100 % nutrient solution concentration) and Y_{ij} is the observation of the i -th treatment in its j -th replication (50 % nutrient solution concentration).

Subsequently, Tukey's multiple comparison test ($P \leq 0.05$) was performed.

Macronutrient concentration

The aerial dry biomass (leaves and stems) of the six replicates was ground with an electric mill (004108-013-000, Osterizer®, USA). Subsequently, the concentration of N (by the microkjeldahl method), P (by colorimetry), K (by flamometry), and Ca and Mg (both by atomic absorption spectrophotometry) were determined (Cruz-Álvarez et al., 2020).

Mycorrhizal colonization and number of spores

As an indicator of the efficiency and functionality of the inocula in basil plants, the percentage of mycorrhizal colonization (PMC) by fungal structure was determined at 50 dat. For this, roots from each replicate were collected at the end of the experiment and fixed in FAA (formaldehyde: acetic acid: ethanol, 2:1:10:7); subsequently, the roots were cleared and stained (Phillips & Hayman, 1970). The percentage of mycorrhizal colonization was evaluated in 30 1-cm root segments, according to the method described by McGonigle, Miller, Evans, Fairchild, and Swan (1990). PMC was determined using a microscope (model k7, Zeiss, Germany).

The number of spores in 100 g of dry soil was determined from extraction by the wet sieving and decanting method (Gerdemann & Nicolson, 1963). Spore counting was performed visually with a stereo microscope (VE -S5C, Velab™). Wet sieving was observed in a gridded Petri dish (90 mm) and the number of spores was recorded.

desnuda. Los hongos se encontraban en arena de río como medio de inoculación.

Inoculación de las plantas de albahaca con *A. brasilense*

Las plantas de albahaca se inocularon con la cepa Cd de *A. brasilense* a una concentración de 1.04×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de sustrato seco (Bashan, 1986). El conteo de las UFC se efectuó de acuerdo con la metodología descrita por Peña-Cortés, Peña-Cortés, y Gonzalo-Moreno (2011). Las macetas tuvieron 3 kg de tezontle, y las inoculaciones se realizaron cada dos semanas a partir del 14 de mayo de 2019 hasta la cosecha, a los 50 ddt.

Variables de crecimiento vegetal

La cosecha se realizó a los 50 ddt y se determinaron las siguientes variables: altura de planta (AP, cm), diámetro basal de tallo (DT, mm), peso de biomasa aérea fresca (PBF, g), peso de biomasa aérea seca (PBS, g) y área foliar (AF, cm²).

Disminución de crecimiento en albahaca por efecto de la reducción en la concentración de nutrientes de la solución nutritiva

Se determinó la reducción porcentual de los caracteres altura de planta, peso de biomasa fresca y área foliar, al disminuir la concentración de la solución nutritiva de 100 % (tratamiento 7) a 50 % (tratamientos 1 a 6)

$$\text{Disminución de crecimiento vegetal} = \left(\frac{\bar{Y}_7 - Y_{ij}}{\bar{Y}_7} \right) \times 100$$

mediante la siguiente fórmula:

$$i = 1, 2, \dots, 6 ; \quad j = 1, 2, \dots, 6$$

donde \bar{Y}_7 es la media del tratamiento siete (100 % de concentración de solución nutritiva) y Y_{ij} es la observación del i -ésimo tratamiento en su j -ésima repetición (50 % de concentración de solución nutritiva).

Posteriormente, se realizaron comparaciones múltiples de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Concentración de macronutrientes

La biomasa seca aérea (hojas y tallos) de las seis repeticiones se molió con un molino eléctrico (004108-013-000, Osterizer®, EUA). Posteriormente, se determinó la concentración de N (por el método microkjeldahl), P (por colorimetría), K (por flamometría), Ca y Mg (ambos por espectrofotometría de absorción atómica) (Cruz-Álvarez et al., 2020).

Statistical analysis

Data expressed as percentages were transformed with the arcsine square root function. Normality and homogeneity of variance were checked using the Levene and Kolmogorov-Smirnov test. Subsequently, analysis of variance and Tukey's multiple comparison test ($P \leq 0.05$) were performed using Statistical Analysis System version 9.1 software (SAS Institute Inc., 2004).

Results and discussion

Growth of basil inoculated with AMF and *A. brasilense*

When considering the treatments with 50 % nutrient solution (treatments 1 to 6) and comparing them with the control (without microorganisms) (Table 1), only *A. brasilense* significantly improved the development of 'Sweet Nufar' basil plants, by increasing PH, SD, FBW, DBW and LA ($P \leq 0.05$), by 15, 18, 28, 27 and 24 %, respectively. The application of *Rizhophagus intraradices* and *R. intraradices* + *A. brasilense* increased FBW and LA ($P \leq 0.05$), while *Funneliformis mosseae* only improved SD and LA ($P \leq 0.05$).

Colonización micorrícica y número de esporas

Como indicador de eficiencia y funcionalidad de los inóculos en las plantas de albahaca, se determinó el porcentaje de colonización micorrícica (PCM) por estructura fúngica a los 50 ddt. Para ello, se recolectaron raíces de cada repetición al finalizar el experimento, las cuales se fijaron en FAA (formaldehído: ácido acético: etanol, 2:1:10:7); posteriormente, las raíces se clarearon y tiñeron (Phillips & Hayman, 1970). El porcentaje de colonización micorrícica se evaluó en 30 segmentos de raíz de 1 cm, de acuerdo con el método descrito por McGonigle, Miller, Evans, Fairchild, y Swan (1990), y con un microscopio (modelo k7, Zeiss, Alemania) se determinó el PCM.

El número de esporas en 100 g de suelo seco se determinó a partir de la extracción realizada por el método de tamizado húmedo y decantación (Gerdemann & Nicolson, 1963). El conteo de esporas se realizó de manera visual con un microscopio estereoscópico (VE-S5C, Velab™). El tamizado húmedo se observó en una caja de Petri cuadrículada (90 mm) y se registró el número de esporas.

Table 1. Growth of 'Sweet Nufar' basil plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and *A. brasilense* under greenhouse conditions.

Cuadro 1. Crecimiento de plantas de albahaca 'Sweet Nufar' inoculadas con hongos micorrícicos arbusculares y *A. brasilense* en condiciones de invernadero.

| Treatment / Tratamiento | PH (cm)/ AP (cm) | SD (mm)/ DT (mm) | FBW (g)/ PBF (g) | DBW (g)/ PBS (g) | LA (cm ²)/ AF (cm ²) |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---|
| Control (without microorganisms)/ Testigo (sin microorganismos) | 35.2 b ^z | 6.6 b | 99.4 c | 10.6 b | 2026.6 b |
| <i>Rizhophagus intraradices</i> | 37.8 ab | 7.2 ab | 118.7 ab | 12.1 ab | 2492.5 a |
| <i>Funneliformis mosseae</i> | 37.7 ab | 7.4 a | 112.9 abc | 12.2 ab | 2373.8 a |
| Cerro del Metate consortium/ Consortio Cerro del Metate | 39.0 ab | 7.3 ab | 111.4 bc | 11.6 ab | 2302.4 ab |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | 40.6 a | 7.8 a | 127.5 a | 13.5 a | 2518.2 a |
| <i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> | 36.5 ab | 7.3 ab | 123.0 ab | 12.1 ab | 2516.3 a |
| CV (%) | 7.54 | 6.61 | 7.33 | 10.34 | 7.12 |
| LSD/DMSH | 5.00 | 0.78 | 14.87 | 2.18 | 296.57 |

PH = plant height; SD = stem diameter; FBW = fresh biomass weight; DBW = dry biomass weight; LA = leaf area; CV = coefficient of variation; LSD = least significant difference. ^zMeans with the same letter within each column did not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

AP = altura de planta; DT = diámetro de tallo; PBF = peso de biomasa fresca; PBS = peso de biomasa seca; AF = área foliar; CV = coeficiente de variación; DMSH = diferencia mínima significativa honesta. ^zMedias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

The Cerro del Mate consortium did not show advantages over the control without microorganisms.

Cruz-Romero, Barrios-Díaz, Rodríguez-Mendoza, Espinoza-Victoria, and Tirado-Torres (2016) reported similar effects on growth when inoculating broccoli plants with *A. brasilense*; the increases were 11 % in SD, 38 % in LA, and 29 % in DBW. Likewise, it has been documented that *A. brasilense* increases nitrogen assimilation in species such as maize and wheat (Mariani-Zeffa et al., 2019; Shintate-Galindo et al., 2020), which favors plant development, even when fertilization levels are limited. The above coincides with the results of the present study, since a 15 % increase in nitrogen concentration was observed in the tissues of the plants inoculated with *A. brasilense* with respect to the control (Table 2). In this regard, Pereira-Coelho et al. (2021) note that *A. brasilense* forms symbiosis with some plants and increases their water and nutrient assimilation capacity, which improves the growth and yield of agricultural crops.

Inoculation of *R. intraradices* improved FBW by 7 % and LA by 22 %, while *F. mosseae* increased SD by 12 % and LA by 17 % compared to the control (Table 1). Favorable effects from the use of AMF have also been reported in tomato (Bona et al., 2017) and broad bean (Abd-Alla, El-Enany, Nafady, Khalaf, & Morsy, 2014). This implies that the species *R. intraradices* and *F. mosseae* are also an option to improve basil crop development, although their effect is less than that achieved with *A. brasilense*.

The combination of *R. intraradices* + *A. brasilense* increased FBW by 24 % and LA by 24 % compared to the control. This coincides with the findings reported by Mujica-Pérez, Medina-Carmona, and Rodríguez-Guerra (2017), who point out that the inoculation of growth-promoting bacteria in combination with AMF generates a synergistic effect that is reflected in better plant development.

Basil growth due to reducing the nutrient solution concentration

When comparing the effect of nutrient concentration (100 and 50 %) on crop development, inoculation with *A. brasilense* had the smallest decrease in basil growth ($P \leq 0.05$) due to the effect of nutrient reduction on the variables PH, FBW and LA; however, its response was similar to the decrease in growth with AMF inoculation and the combination of *R. intraradices* + *A. brasilense* (Figure 1). The greatest decreases in growth occurred when no beneficial microorganism was inoculated. Specifically, plants without microorganisms had a decrease of 15.6 % in PH, 49.9 % in FBW and 46.6 % in LA. This indicates that inoculation with growth-promoting

Análisis estadístico

Los datos expresados en porcentaje se transformaron con la función raíz cuadrada del arcoseno. La normalidad y homogeneidad de varianza se comprobaron mediante la prueba de Levene y Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, se realizó el análisis de varianza y las comparaciones múltiples de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) mediante el programa *Statistical Analysis System* versión 9.1 (SAS Institute Inc., 2004).

Resultados y discusión

Crecimiento de albahaca inoculada con HMA y *A. brasilense*

Al considerar los tratamientos con 50 % de solución nutritiva (tratamientos 1 a 6) y compararlos con el testigo (sin microorganismos) (Cuadro 1), solo *A. brasilense* mejoró significativamente el desarrollo de las plantas de albahaca 'Sweet Nufar', al incrementar la AP, el DT, el PBF, el PBS y el AF ($P \leq 0.05$), en un 15, 18, 28, 27 y 24 %, respectivamente. La aplicación de *Rizhophagus intraradices* y *R. intraradices* + *A. brasilense* incrementaron el PBF y el AF ($P \leq 0.05$); en tanto que *Funneliformis mosseae* solo mejoró el DT y el AF ($P \leq 0.05$). El consorcio Cerro del Mate no mostró ventajas sobre el testigo sin microorganismos.

Cruz-Romero, Barrios-Díaz, Rodríguez-Mendoza, Espinoza-Victoria, y Tirado-Torres (2016) reportaron efectos similares sobre el crecimiento al inocular plantas de brócoli con *A. brasilense*; los incrementos fueron de 11 % en DT, 38 % en AF y 29 % en PBS. Asimismo, se ha documentado que *A. brasilense* incrementa la asimilación de nitrógeno en especies como maíz y trigo (Mariani-Zeffa et al., 2019; Shintate-Galindo et al., 2020), lo cual favorece el desarrollo de las plantas, incluso cuando los niveles de fertilización son limitados. Lo anterior coincide con los resultados del presente estudio, ya que se observó un incremento de 15 % en la concentración de nitrógeno en los tejidos de las plantas inoculadas con *A. brasilense* con respecto al testigo (Cuadro 2). Al respecto, Pereira-Coelho et al. (2021) mencionan que *A. brasilense* forma simbiosis con algunas plantas e incrementa su capacidad de asimilación de agua y nutrientes, lo cual mejora el crecimiento y el rendimiento de los cultivos agrícolas.

La inoculación de *R. intraradices* mejoró en 7 % el PBF y 22 % el AF, mientras que *F. mosseae* incrementó el DT 12 % y 17 % el AF en comparación con el testigo (Cuadro 1). Efectos favorables por el uso de HMA también se han reportado en tomate (Bona et al., 2017) y en haba (Abd-Alla, El-Enany, Nafady, Khalaf, & Morsy, 2014). Esto implica que las especies *R. intraradices* y

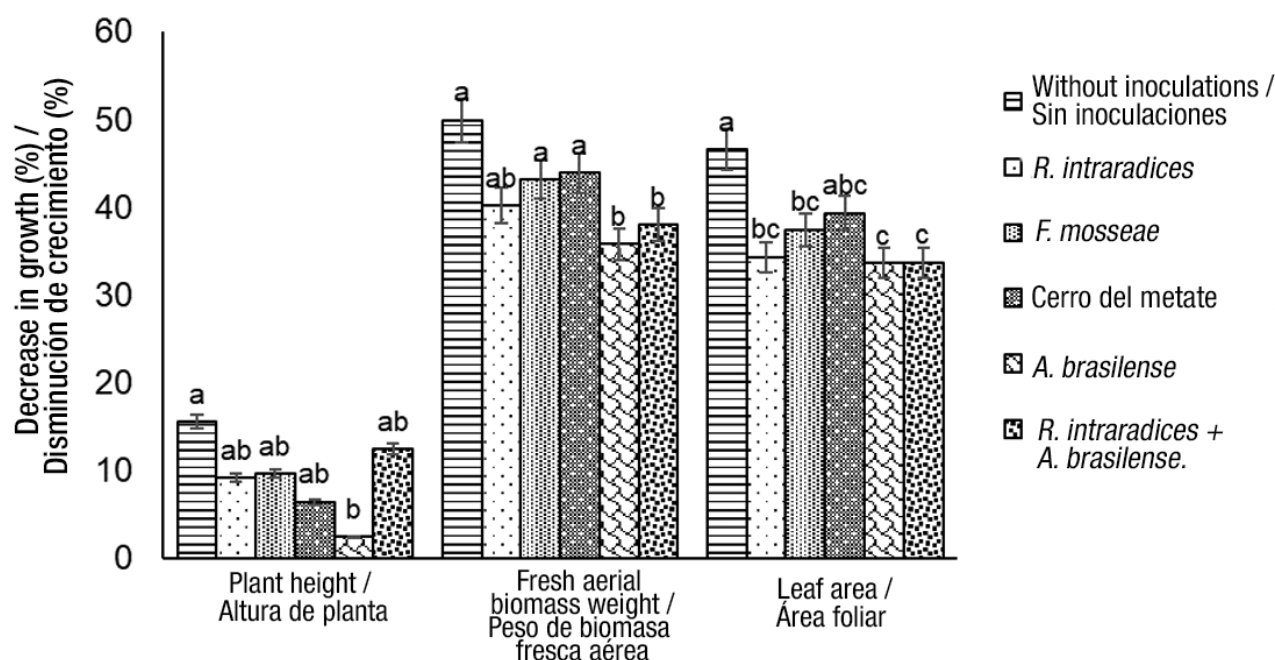


Figure 1. Decreased growth in 'Sweet Nufar' basil grown with 50 % nutrient solution compared to 100 % nutrient solution treatment, 50 days after transplanting. Each bar represents the average of six replicates \pm standard error. Bars with the same letter between each response variable do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 1. Disminución de crecimiento en albahaca 'Sweet Nufar' cultivada con solución nutritiva al 50 % en comparación con el tratamiento al 100 % de solución nutritiva, 50 días después del trasplante. Cada barra representa el promedio de seis repeticiones \pm error estándar. Barras con la misma letra entre cada variable respuesta no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

rhizobacteria has the ability to improve basil plant development and increase PH and FBW, determining variables in the growth of this crop (Chiquito-Contreras et al., 2018).

Macronutrient concentration

The use of beneficial microorganisms improved the concentration of nutrients in the basil plant tissue, mainly N and K ($P \leq 0.05$), compared to the control without microorganisms (Table 2). The N concentration increased ($P \leq 0.05$) in plants inoculated with *R. intraradices* (17 %), *A. brasilense* (16 %) and with the combination of both microorganisms (15 %). Regarding P, only *A. brasilense* increased ($P \leq 0.05$) its concentration in plant tissues, by 11 %, while K concentration had no significant changes due to the effect of microorganism inoculation. The highest Mg concentrations occurred with the inoculation of *R. intraradices* and *F. mosseae*, with significant increases ($P \leq 0.05$) of 18 and 20 %, respectively, compared to the control. It has been reported that the use of beneficial microorganisms such as rhizobacteria and AMF allow plants to absorb greater amounts of essential nutrients (Díaz-Hernández et al., 2018). In the case of Ca concentration, there were no significant effects from the inoculation of microorganisms.

F. mosseae también son una opción para mejorar el desarrollo del cultivo de albahaca, aunque su efecto es menor que el logrado con *A. brasilense*.

La combinación entre *R. intraradices* + *A. brasilense* incrementó 24 % el PBF y 24 % el AF en comparación con el testigo. Esto coincide con lo reportado por Mujica-Pérez, Medina-Carmona, y Rodríguez-Guerra (2017), quienes señalan que la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en combinación con HMA genera un efecto sinérgico que se refleja en un mejor desarrollo de las plantas.

Crecimiento en albahaca por efecto de la reducción en la concentración de la solución nutritiva

Al comparar el efecto de la concentración nutritiva (100 y 50 %) en el desarrollo del cultivo, la inoculación con *A. brasilense* tuvo la menor disminución en el crecimiento ($P \leq 0.05$) de albahaca por efecto de la reducción de nutrientes en las variables AP, PBF y AF; no obstante, su respuesta fue similar a la disminución en el crecimiento con la inoculación de HMA y la combinación de *R. intraradices* + *A. brasilense* (Figura 1). Las mayores disminuciones del desarrollo ocurrieron cuando no se inoculó algún microorganismo benéfico.

Table 2. Effect of the inoculation of beneficial microorganisms on macronutrient concentration in 'Sweet Nufar' basil grown in tezontle and under greenhouse conditions.

Cuadro 2. Efecto de la inoculación de microorganismos benéficos en la concentración de macronutrientes en albahaca 'Sweet Nufar' cultivada en tezontle y en condiciones de invernadero.

| Treatment / Tratamiento | N | P | K | Ca | Mg |
|--|---------------------|---------|---------|--------|---------|
| | (%) | | | | |
| Control (without microorganisms)/ Testigo (sin microorganismos) | 2.99 b ^z | 0.44b | 2.53 c | 2.02 a | 1.06 bc |
| <i>Rizhophagus intraradices</i> | 3.49 a | 0.47 ab | 2.71 bc | 1.93 a | 1.28 a |
| <i>Funneliformis mosseae</i> | 3.22 ab | 0.47 ab | 2.95 ab | 2.02 a | 1.25 a |
| Cerro del Metate consortium/ Consortio Cerro del Metate | 3.12 ab | 0.44 b | 3.04 a | 2.10 a | 1.07 bc |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | 3.46 a | 0.49 a | 2.86 ab | 1.26 b | 1.20 ab |
| <i>R. intraradices</i> + <i>A. brasilense</i> | 3.44 a | 0.46 b | 2.93 ab | 1.79 a | 1.01 bc |
| CV (%) | 4.67 | 2.69 | 3.19 | 8.66 | 4.41 |
| LSD/DMSH | 0.42 | 0.03 | 0.24 | 0.47 | 0.14 |

CV = coefficient of variation; LSD = least significant difference. ^zMeans with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

CV = coeficiente de variación; DMSH = diferencia mínima significativa honesta. ^zMedias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

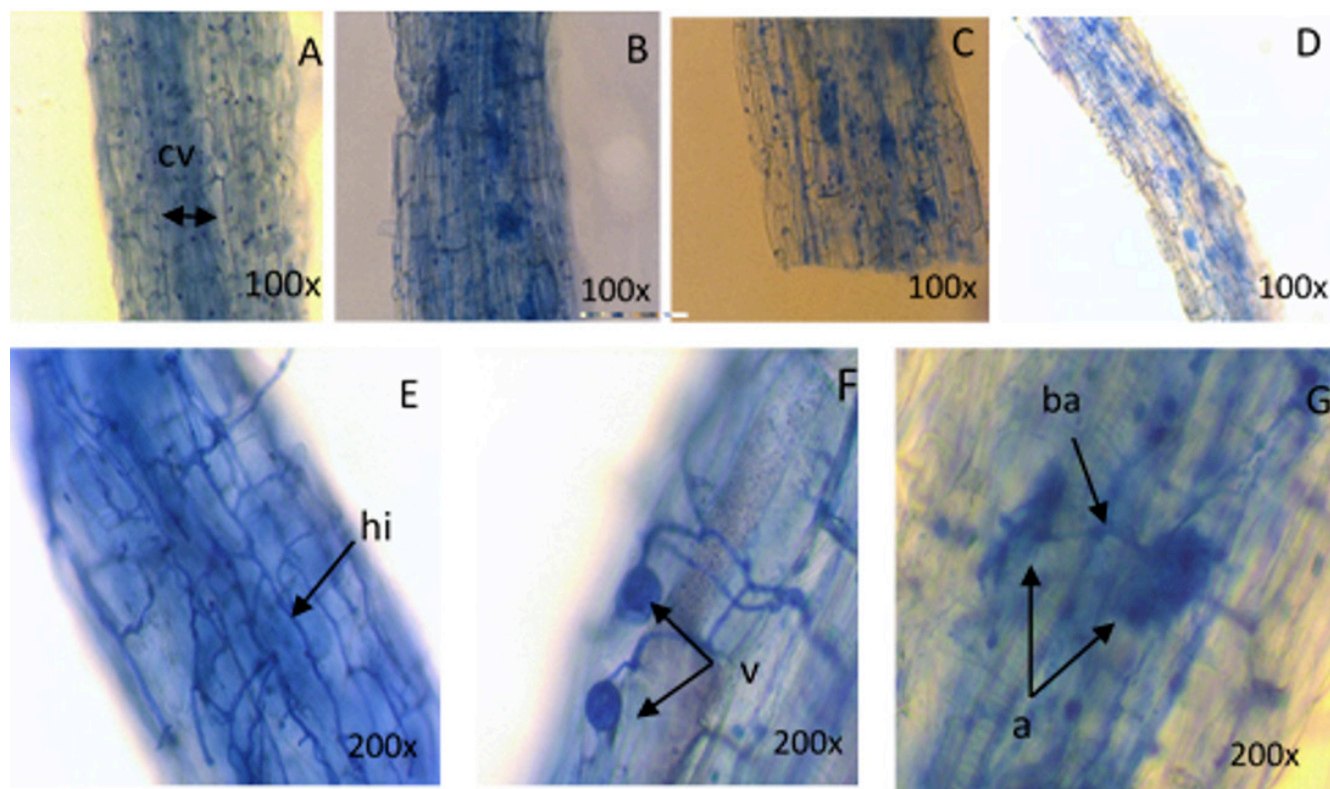


Figure 2. Longitudinal sections of 'Sweet Nufar' basil roots colonized with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF): A) control (cv = vascular cylinder), B) *Rhizopagus intraradices*, C) *Funneliformis mosseae*, D) Cerro del Metate AMF consortium, E) intraradical hyphae (hi), F) vesicles (v), and G) arbuscules (a) and base of the arbuscule (ba).

Figura 2. Secciones longitudinales de raíces de albahaca 'Sweet Nufar' colonizadas con hongos micorrícicos arbusculares (HMA): A) testigo (cv = cilindro vascular), B) *Rhizopagus intraradices*, C) *Funneliformis mosseae*, D) consorcio de HMA Cerro del Metate, E) hifas intrarradicales (hi), F) vesículas (v), y G) arbúsculos (a) y base del arbúsculo (ba).

Mycorrhizal colonization and number of AMF spores

Figure 2A shows a longitudinal root section of the control, where no AMF structure was observed. In the colonization of mycorrhizal fungi *R. intraradices* (Figure 2B), *F. mosseae* (Figure 2C) and the Cerro del Metate consortium (Figure 2D) on basil roots, the presence of some characteristic AMF structures, such as intraradical hyphae, vesicles and arbuscules, was observed (Figures 2E, 2F and 2G). The functionality of mycorrhiza on plant nutrition is associated with the degree of maturity of the mycorrhiza and with the conditions in which it develops (Lara-Pérez et al., 2014).

AMF inocula colonized plant roots, as the percentage of mycorrhizal colonization by hyphae was the highest (35.9 - 37.7 %), followed by arbuscules (13.0 - 14.8 %); however, there were no significant differences ($P \leq 0.05$) between them (Figure 3). Regarding vesicles, the range was 4 - 8 %, and differences ($P \leq 0.05$) were found between *R. intraradices* and the rest of the AMF. These results differ with those reported by Elhindi, El-Din, and Elgorban (2017), who found a PMC between 60.6 and 71.1 % in 'Nano Compatt' basil, while Zulueta et al. (2016) reported a PMC between 75 and 87 % in 'Nufar' basil. These differences can be attributed to the growing conditions, the use of different substrates, the inoculated AMF and the exposure time of the plants to the inoculum, since in those studies the duration of the experiments was 70 and 120 days, respectively.

De esta manera, las plantas sin microorganismos tuvieron una disminución de 15.6 % en AP, 49.9 % en PBF y 46.6 % en AF. Lo anterior indica que la inoculación con rizobacterias promotoras de crecimiento tiene la capacidad de mejorar el desarrollo de plantas de albahaca e incrementar la AP y el PBF, variables determinantes en el crecimiento de dicho cultivo (Chiquito-Contreras et al., 2018).

Concentración de macronutrientes

El uso de microorganismos benéficos mejoró la concentración de nutrientes en el tejido de las plantas de albahaca, principalmente de N y K ($P \leq 0.05$), respecto del testigo sin microorganismos (Cuadro 2). La concentración de N incrementó ($P \leq 0.05$) en las plantas inoculadas con *R. intraradices* (17 %), *A. brasilense* (16 %) y con la combinación de ambos microorganismos (15 %). En cuanto al P, solo *A. brasilense* incrementó ($P \leq 0.05$) en 11 % su concentración en los tejidos de las plantas, mientras que la concentración de K no tuvo modificaciones significativas por efecto de la inoculación de microorganismos. Las mayores concentraciones de Mg ocurrieron con la inoculación de *R. intraradices* y *F. mosseae*, con incrementos significativos ($P \leq 0.05$) de 18 y 20 %, respectivamente, en comparación con el testigo. Se ha reportado que el uso de microorganismos benéficos como rizobacterias y HMA permiten a las plantas absorber cantidades mayores de nutrientes

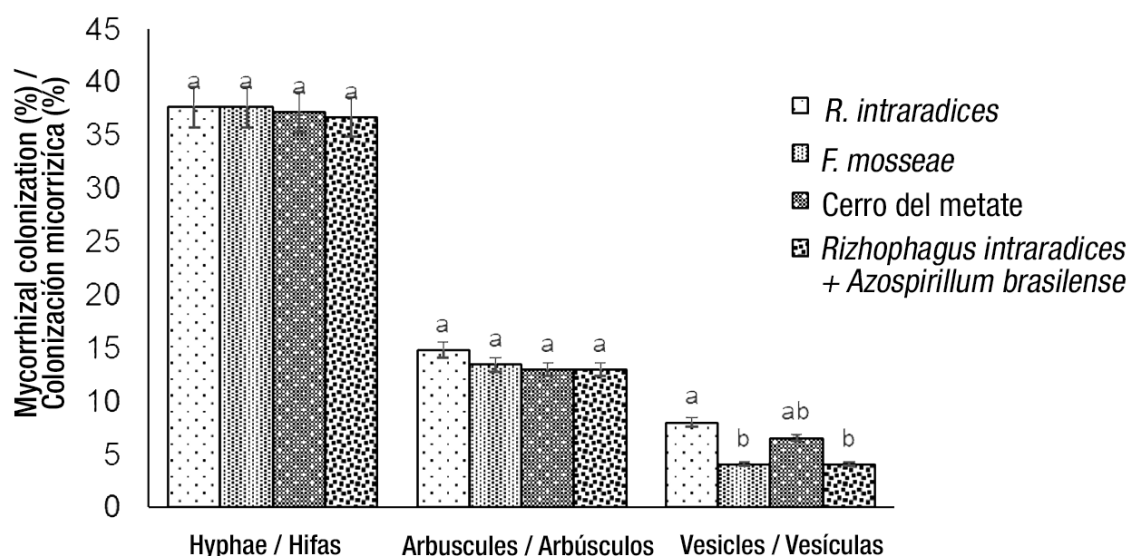


Figure 3. Mycorrhizal colonization on 'Sweet Nufar' basil roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) 50 days after transplanting. Each bar represents the average of six replicates \pm standard error. Bars with the same letter between each response variable do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 3. Colonización micorrízica en raíces de albahaca 'Sweet Nufar' inoculada con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) a 50 días después del trasplante. Cada barra representa el promedio de seis repeticiones \pm error estándar. Barras con la misma letra entre cada variable respuesta no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

With the co-inoculation of *R. intraradices* + *A. brasilense* there was no positive effect on the PMC of AMF, which contrasts with the findings reported by Meng et al. (2015) in maize and soybean, since the interaction of AMF and growth-promoting bacteria tends to increase the population of both individuals in the rhizosphere and, consequently, increases in PMC can occur. In addition, it was confirmed that the control and the treatment with *A. brasilense* presented 0 % colonization, since these treatments did not contain AMF.

Another indicator to determine mycorrhizal efficiency is the number of spores present in the substrate where the plants developed. At 50 dat, no differences ($P \leq 0.05$) were found in the number of spores, where values ranged from 240 to 272 spores per 100 g of substrate. These values are considered low compared to those reported by Quiñones-Aguilar, López-Pérez, Hernández-Acosta, Ferrera-Cerrato, and Rincón-Enríquez (2014), who in papaya cultivation found 1,000 to 4,500 spores after 120 days of inoculation on organic substrates.

It is important to note that AMF sporulation is a survival mechanism (Johnson, 1984), which could be influenced by the type of substrate. Corbera, Paneque, Calaña, and Morales (2008) point out that the physical and biological properties of the substrate are determining factors in the proper development of AMF, as well as the age of the plant (Agüero-Fernández et al., 2016). In the present study, tezontle was used as growth medium and, since it is an inert substrate, it could have interfered in the sporulation process; however, that same inert characteristic guaranteed that the results obtained are due to the effect of the microorganisms and their interaction with the basil plants.

Conclusions

The arbuscular mycorrhizal fungi *Rizhophagus intraradices* and *Funneliformis mosseae*, the mycorrhizal consortium Cerro del Metate and the bacterium *Azospirillum brasilense* improved the growth of 'Sweet Nufar' basil, which was expressed in the increase in fresh biomass weight and leaf area. This increase was associated with a higher concentration of nitrogen and potassium in the plant tissue. The microorganisms evaluated in the growth of basil grown with a reduced level of mineral nutrition can serve as a sustainable alternative in the agronomic management of this crop under greenhouse conditions.

Acknowledgments

The first author thanks the National Council of Science and Technology (CONACYT) for the scholarship (719948)

esenciales (Díaz-Hernández et al., 2018). En el caso de la concentración de Ca, no hubo efectos significativos por la inoculación de microorganismos.

Colonización micorrícica y número de esporas de HMA

En la Figura 2A se muestra un corte longitudinal de raíz del testigo, donde no se observó ninguna estructura de los HMA. En la colonización de los hongos micorrícicos *R. intraradices* (Figura 2B), *F. mosseae* (Figura 2C) y consorcio Cerro del Metate (Figura 2D) en raíces de albahaca se observó la presencia de algunas estructuras características de los HMA, como hifas intrarradicales, vesículas y arbusculos (Figuras 2E, 2F y 2G). La funcionalidad de las micorrizas sobre la nutrición de la planta se asocia con el grado de madurez de la micorriza y con las condiciones en las que se desarrolle (Lara-Pérez et al., 2014).

Los inóculos de HMA colonizaron las raíces de las plantas, ya que los porcentajes de colonización micorrícica por hifas fueron los más altos (35.9 - 37.7 %), seguidos por los arbusculos (13.0 - 14.8 %); sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre ellos (Figura 3). En cuanto a las vesículas, el intervalo fue de 4 a 8 %, y se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) entre *R. intraradices* y el resto de los HMA. Estos resultados difieren con los reportados por Elhindi, El-Din, y Elgorban (2017), quienes encontraron un PCM entre 60.6 y 71.1 % en albahaca 'Nano Compatt'; en tanto que Zulueta et al. (2016) reportaron PCM de entre 75 y 87 % en albahaca 'Nufar'. Estas diferencias se pueden atribuir a las condiciones de cultivo, al uso de diferentes sustratos, a los HMA inoculados y al tiempo de exposición de las plantas al inóculo, ya que en esos estudios la duración de los experimentos fue de 70 y 120 días, respectivamente.

Con la coinoculación de *R. intraradices* + *A. brasilense* no hubo un efecto positivo sobre el PCM del HMA, lo cual contrasta con lo reportado por Meng et al. (2015) en maíz y soya, ya que la interacción de HMA y bacterias promotoras de crecimiento tiende a incrementar la población de ambos individuos en la rizosfera y, en consecuencia, se pueden presentar incrementos en el PCM. Además, se confirmó que el testigo y el tratamiento con *A. brasilense* presentaron 0 % de colonización, ya que estos tratamientos no contenían HMA.

Otro indicador para determinar la eficiencia micorrícica es el número de esporas presentes en el sustrato donde se desarrollaron las plantas. A los 50 ddt, no se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) en el número de esporas, donde los valores oscilaron entre 240 y 272 esporas por cada 100 g de sustrato. Estos valores se consideran bajos comparados con los reportados por Quiñones-Aguilar,

granted for his Ph.D. studies in Agricultural Sciences and Rural Development.

End of English version

References / Referencias

- Abd-Alla, M. H., El-Enany, A., Nafady, N., Khalaf, D., & Morsy, F. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*, 169(1), 49-58. doi: 10.1016/j.micres.2013.07.007
- Agüero-Fernández, Y. M., Hernández-Montiel L. G., Nieto-Garibay, A., Troyo-Diéguez, E., Zulueta-Rodríguez, R., & Murillo-Amador, B. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi as agents of NaCl mitigators in basil seedlings. *Nova Scientia*, 8(2), 60-86. doi: 10.1128/aem.51.5.1067-1071.1986
- Bashan, Y. (1986). Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd. Following temporary depression of rhizosphere microflora. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1067-1071. doi: 10.1128/aem.51.5.1067-1071.1986
- Berendsen, R., Pieterse, C. M., & Bakker, P. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486. doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001
- Bona, E., Cantamessa, S., Massa, N., Manassero, P., Marsano, F., Copetta A., Lingua, G., D'Aostino, G., Gamalero, E., & Berta G. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza*, 27(1), 1-11. doi: 10.1007/s00572-016-0727-y
- Brundrett, M., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108-1115. doi: 10.1111/nph.14976
- Camarena-Gutiérrez, G. (2012). Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares, *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales*, 18(3), 409-421. doi: 10.5154/r.rchscfa.2011.11.093
- Canto-Martín, J., Medina-Peralta, S., & Morales-Avelino, D. (2004). Effect of *Azospirillum* sp. inoculation in habanero chile plants (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4(1), 21-27. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/939/93940104.pdf>
- Chiquito-Contreras, R., Reyes-Pérez, J., Chiquito-Contreras, J., Vidal-Hernández, L., & Hernández-Montiel, L. (2020). Efecto de rizobacterias y dosis reducidas de fertilizantes sintéticos sobre la expresión morfo-productiva de tomate en invernadero. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 116(1), 19-29. doi: 10.12706/itea.2019.015
- Chiquito-Contreras, R. G., Solís-Palacios, R., Reyes-Pérez, J. J., Murillo-Amador, B., Alejandro-Rosas, J., & Hernández-Montiel, L. G. (2018). Growth promotion of sweet basil by arbuscular mycorrhizal fungi and a marine bacterium. *Acta Universitaria*, 28(6), 68-76. doi: 10.15174/au.2018.2086
- Corbera, C. J., Paneque, V. M., Calaña, J. M., & Morales, C. (2008). Evaluación de sustratos y aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el cultivo de López-Pérez, Hernández-Acosta, Ferrera-Cerrato, y Rincón-Enríquez (2014), quienes en el cultivo de papaya encontraron de 1,000 a 4,500 esporas después de 120 días de inoculación en sustratos orgánicos.
- Resulta importante señalar que la esporulación de los HMA es un mecanismo de supervivencia (Johnson, 1984), el cual podría ser influenciado por el tipo de sustrato. Corbera, Paneque, Calaña, y Morales (2008) señalan que las propiedades físicas y biológicas del sustrato son determinantes en el buen desarrollo de los HMA, así como la edad de la planta (Agüero-Fernández et al., 2016). En el presente estudio, se utilizó tezontle como medio de crecimiento y, debido a que es un sustrato inerte, pudo haber interferido en el proceso de esporulación; no obstante, esa misma característica inerte garantizó que los resultados obtenidos se deben al efecto de los microorganismos y a su interacción con las plantas de albahaca.
- ## Conclusiones
- Los hongos micorrízicos arbusculares *Rizhophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae*, el consorcio micorrízico Cerro del Metate y la bacteria *Azospirillum brasilense* mejoraron el crecimiento de albahaca 'Sweet Nufar', el cual se expresó en el incremento del peso de biomasa fresca y del área foliar. Este aumento estuvo asociado con una mayor concentración de nitrógeno y potasio en el tejido vegetal. Los microorganismos evaluados en el crecimiento de albahaca cultivada con un nivel reducido de nutrición mineral pueden servir de alternativa sustentable en el manejo agronómico de este cultivo en condiciones de invernadero.
- ## Agradecimientos
- El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (719948) otorgada para sus estudios de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural.
- ## Fin de la versión en español
- Anthurium andreaeanum* en etapa de vivero. *Cultivos Tropicales*, 29(4), 50-62. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362008000400004
- Cruz-Álvarez, O., Hernández-Rodríguez, O. A., Jacobo-Cuellar, J. L., Ávila-Quezada, G., Morales-Maldonado, E., Parra-Quezada, R. A., Robles-Hernández, L., & Ojeda-Barrios, D. L. (2020). Nitrogen fertilization in pecan and its effect on leaf nutrient concentration, yield and nut quality. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 26(3), 163-173. doi: 10.5154/r.rchsh.2019.10.021
- Cruz-Romero, W., Barrios-Díaz, J. M., Rodríguez-Mendoza, M. N., Espinoza-Victoria, D., & Tirado-Torres, J. L. (2016). Producción de plántulas de hortalizas con *Azospirillum*

- sp. y aspersión foliar de miel de abeja. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(1), 59-70. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263144153005>
- Díaz-Hernández, B. G., Aguirre-Medina, J. F., & Díaz-Fuentes V. H. (2018). Rendimiento de *Jatropha curcas* L. inoculada con micorriza y aplicación de composta de caña. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(4), 599-610. doi: 10.29312/remexca.v4i4.1192
- Elhindi, K. M., El-Din, A. S., & Elgorban, A. M. (2017). The impact of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating salt-induced adverse effects in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 170-179. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.010
- García-Gutiérrez, L., Romero, D., Zerriouh, H., Cazorla, F. M., Torés, J. A., Vicente, A., & Pérez-García, A. (2012). Isolation and selection of plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic resistance in melon. *Plant Soil*, 358, 201-212. doi: 10.1007/s11104-012-1173-z
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235-244. doi: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0
- Huang, L., Chen, D., Zhang, H., Song, Y., Chen, & Tang, M. (2019). Funneliformis mosseae enhances root development and Pb phytostabilization in Robinia pseudoacacia in Pb-contaminated soil. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2591. doi: 10.3389/fmicb.2019.02591
- Johnson, C. R. (1984). Phosphorus nutrition on mycorrhizal colonization, photosynthesis, growth and nutrient composition of *Citrus aurantium*. *Plant and Soil*, 80(1), 35-42. doi: 10.1007/BF02232937
- Juárez-Rosete, C., Aguilar-Castillo, J., Juárez-Rosete, M., Bugarin-Montoya, R., Juárez-López, P., & Cruz-crespo, E. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias*, 2(3), 119-129. doi: 10.15741/revbio.02.03.06
- Köhl, L., Lukasiewicz, C. E., & van der Heijden, M. G. (2016). Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant, Cell and Environment*, 39(1), 136-146. doi: 10.1111/pce.12600
- Lara-Pérez, L. A., Noa-Carrazana, J. C., Landa-López, Á., Hernández-González, S., Oros-Ortega, I., & Andrade-Torres, A. (2014). Colonization and structure of arbuscular mycorrhizal fungi community in *Alsophila firma* (Cyatheales: Cyatheaceae) from a tropical montane cloud forest in Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*, 62(4), 1609-1623. doi: 10.15517/rbt.v62i4.13324
- Mariani-Zeffa, D., Junior-Perini, L., Barbosa-Silva, M., Vieira-de Sousa, N., Scapim, C. A., Martínez-de Oliveira, A. L., do Amaral, A., & Azeredo-Gonçalves, L. S. (2019). Azospirillum brasilense promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PLoS One*, 14(4), 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0215332
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115(3), 495-501. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x
- Meng, L., Zhang, A., Wang, F., Han, X., Wang, D., & Li, S. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium facilitate nitrogen uptake and transfer in soybean/maize intercropping system. *Frontiers in Plant Science*, 6, 339. doi: 10.3389/fpls.2015.00339
- Mujica-Pérez, Y., Medina-Carmona, A., & Rodríguez-Guerra, E. (2017). Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria in peanut crop (*Arachis hypogaea* L.). *Cultivos Tropicales*, 38(2), 15-21. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v38n2/ctr02217.pdf>
- Peña-Cortés, C. A., Peña-Cortés, L. C., & Gonzalo-Moreno, C. (2011). Sistema de visión artificial para el reconocimiento y el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC). *Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada*, 1(17), 9-15. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/272180468_Sistema_de_Vision_Artificial_para_el_Reconocimiento_y_el_Conteo_de_Unidades_Formadoras_de_Colonias_UFC
- Pereira-Coelho, S., Cardoso-Galvão, J. C., Giehl, J., Vicente-de Jesus, É., Ferreira-Mendonça, B., de Almeida-Campos, S., Freitas-Brito, L., Rocha-dos Santos, T., de Rocha-Dourado, E., & Megumi-Kasuya, M. C. (2021). Azospirillum brasilense increases corn growth and yield in conventional low input cropping systems. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 36(3), 225-233. doi: 10.1017/S1742170520000241
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-160. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Quiñones-Aguilar, E. E., López-Pérez, L., Hernández-Acosta, E., Ferrera-Cerrato, R., & Rincón-Enríquez, G. (2014). Simbiosis micorrízica arbuscular y fuentes de materia orgánica en el crecimiento de *Carica papaya* L. *Interciencia*, 39(3), 198-204. Retrieved from <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/10/198-c-RINCON-ENRIQUEZ-7.pdf>
- SAS Institute Inc. (2004). *Statistical Analysis System: User's guide*, ver. 9.1. Cary, N.C., USA: Author.
- Shintate-Galindo, F., Buzetti, S., Lima-Rodrigues, W., Marcandalli-Boleta, E. H., Martins-Silva, V., Rimoldi-Tavanti, R. F., Fernandes, G. C., Campos-Biagini, A. L., Leonel-Rosa, P.A., & Teixeira-Filo, M. C. (2020). Inoculation of *Azospirillum brasilense* associated with silicon as a liming source to improve nitrogen fertilization in wheat crops. *Scientific Reports*, 10(1), 1-18. doi: 10.1038/s41598-020-63095-4
- Smith, S. E., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 227-250. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103846
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. *International congress on soilless culture*, 6, 633-650.
- Tahat, M., Kamaruzaman, S., & Othman, R. (2010). Mycorrhizal fungi as a biological control agent. *Plant Pathology Journal*, 9(4), 198-207. doi: 10.3923/ppj.2010.198.207
- Thioub, M., E., Ewusi-Mensah, N., Sarkodie-Addo, J., & Adjei-Gyapong, T. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation enhances phosphorus use efficiency and

- soybean productivity on a Haplic Acrisol. *Soil and Tillage Research*, 192, 174-186. doi: 10.1016/j.still.2019.05.001
- Trinidad-Cruz, J. R., Quiñones-Aguilar, E. E., Hernández-Cuevas, L. V., López-Pérez, L., & Rincón-Enríquez, G. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi associated in the rhizosphere of *Agave cupreata* in mezcal regions from Michoacán, Mexico. *Scientia Fungorum*, 45, 13-25. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/883/88352759003.pdf>
- Vallejos-Torres, G., Saboya-Pisco, A., & Arévalo-López, L. A. (2021). Efecto bioprotector de micorrizas arbusculares en la reducción de roya (*Hemileia vastatrix*) en la región San Martín. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 1(1), 34-44. doi: 10.51252/raa.v1i1.122
- Zulueta-Rodríguez, R., Hernández-Montiel, L. G., Reyes-Pérez, J. J., González-Morales, G. Y., & Lara-Capistrán, L. (2020). Effects of co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Rhizoglyphus intraradices* in tomato production (*Solanum lycopersicum* L.) in a semi-hydroponic system. *Revista Bio Ciencias*, 7, 671. doi: 10.15741/revbio.07.e671
- Zulueta-Rodríguez, R., Valerio-Landa, S. D., Murillo-Amador, B., Lara-Capistrán, L., Reyes-Pérez, J. J., & Hernández-Montiel, L. G. (2016). Influencia de micorrizas arbusculares en el crecimiento y cambios fisiológicos de la albahaca dulce bajo invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 17, 3557-3568. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263149506014>