



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Determinación de la colonización
intrarradical y extrarradical de hongos
micorrizógenos arbusculares en una selva
alta perennifolia**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Jasso Flores Rosa Isela



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez**

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. **Datos del alumno**
Jasso
Flores
Rosa Isela
56 22 82 22 ext. 44 712
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300267622
2. **Datos del Tutor**
Dr.
Francisco Javier
Álvarez
Sánchez
3. **Datos del sinodal 1**
M. en C.
Irene
Sánchez
Gallen
4. **Datos del sinodal 2**
Dr.
Maria del Pilar
Ortega
Larrocea
5. **Datos del sinodal 3**
Dr.
Francisco Javier
Álvarez
Sánchez
6. **Datos del sinodal 4**
Dr.
Sara Lucía
Camargo
Ricalde
7. **Datos del sinodal 5**
M. en C.
Rosalva
García
Sánchez
8. **Datos del trabajo escrito**
Determinación de la colonización intrarradical y extrarradical de hongos micorrizógenos arbusculares en una selva alta perennifolia
71 p.
2010

D e d i c a t o r i a

A mi papá Gilberto Jasso, a mis madres Rosa Flores y Martha Flores, por todo su amor y paciencia que me han tenido y entregado durante toda mi vida.

My brother for another mother! Hector, hermano del alma... por la vida que ha invertido en mí, por cuidarme, procurarme y quererme, te quiero mucho, por ti... la vida.

A mi compañero de vida y aventuras, Oscar te adoro! Por esos momentos extremos sin fin que hemos compartido, por muchos de los mejores momentos de mi vida.

A mi amado ratón, Enrique Calva.

Oswaldo gracias por estar conmigo en cada momento difícil de estos últimos años, te agradezco enormemente tu dedicación y apoyo hacia mi trabajo y persona, te quiero y admiró.

A g r a d e c i m i e n t o s

A mis sinodales por sus comentarios y apoyo durante la revisión de la tesis, muy en especial a la Dr. Ma. Del Pilar Larrocea, por sus consejos y tiempo en las técnicas de extracción y cuantificación del micelio extrarradical.

A Irene Sánchez Gallén, que con sus comentarios y aportaciones lo hicieron posible y mejor.

Al Dr. Javier Álvarez quien dedico días enteros a la revisión de este trabajo

Mi compañero de laboratorio y cómplice en los experimentos, Oswaldo Núñez

A mis compañeros y amigos que me ayudaron en el muestreo de campo y aguantaron esas largas caminatas cargados de costales, palas y cuanto cosa podíamos llevar,,, Ernesto, Julio, Oswi,

Wendy, Nelly, Irene, muchas gracias!

Chicos!!!! Ernesto, Diego, Primo (Felix), Dulce, Liz, Wendy, Eunice, Irene, gracias por su amistad en el laboratorio he pasado momentos inolvidables con ustedes...

A los trabajadores de la estación de Biología, por las facilidades que otorgaron a este equipo de trabajo durante su estancia.

Al proyecto SEMARNAT-CONACYT-2002-c01-668 por el financiamiento y beca otorgados para la elaboración de este trabajo

INDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introducción | 1 |
| 1.1 | Generalidades de la colonización micorrizica | 1 |
| 1.2 | Factores que afectan la colonización | 8 |
| 1.3 | La selva y su dinámica de regeneración | 10 |
| 1.4 | Deforestación y fragmentación de la selva | 11 |
| 2 | Antecedentes | 13 |
| 3 | Objetivos | 16 |
| 3.1 | Objetivos generales | 16 |
| 3.2 | Objetivos particulares | 16 |
| 4 | Hipótesis | 16 |
| 5 | Métodos | 17 |
| 5.1 | Sitio de estudio, La Reserva de “Los Tuxtlas” | 17 |
| 5.1.1 | Localización geográfica | 17 |
| 5.1.2 | Vegetación | 17 |
| 5.1.3 | Clima | 18 |
| 5.1.4 | Suelos | 18 |
| 5.2 | Muestreo de campo y caracterización de los ambientes | 19 |
| 5.2.1 | Caracterización de los ambientes | 21 |
| 5.3 | Laboratorio | 25 |
| 5.3.1 | Tinción y cuantificación de la colonización intrarradical | 25 |
| 5.3.2 | Extracción de micelio externo | 25 |
| 5.3.3 | Cuantificación de colonización extrarradical | 25 |
| 5.3.4 | Cuantificación de biomasa radical | 25 |
| 5.3.5 | Técnicas de determinación de nutrimentos | 25 |
| 5.4 | Análisis estadístico | 25 |
| 6 | Resultados | 27 |
| 6.1 | Colonización intrarradical | 27 |
| 6.1.1 | Colonización total | 27 |
| 6.1.2 | Colonización por estructuras | 29 |
| 6.2 | Colonización extrarradical | 36 |
| 6.2.1 | Colonización total | 36 |
| 6.3 | Coefficientes de correlación | 41 |
| 6.3.1 | Coefficientes de correlación entre las raíces finas y la colonización intrarradical y extrarradical | 41 |
| 7 | Discusión | 47 |
| 8 | Conclusión | 52 |

| | |
|--|-----------|
| Literatura citada | 53 |
| Apéndice 1. Listado florístico de los ambientes | 63 |
| Apéndice 2. Tinción y cuantificación de la colonización intrarradical | 66 |
| Apéndice 3. Extracción de micelio externo | 67 |
| Apéndice 4. Cuantificación de micelio extrarradical total | 69 |
| Apéndice 5. Cuantificación de biomasa radical | 70 |
| Apéndice 6. Técnicas de análisis de nutrimentos | 71 |

RESUMEN

Los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) establecen una asociación mutualista con las plantas, la cual les permite hacer más eficiente la absorción de nutrimentos. El micelio constituye una de las estructuras más importantes, ya que las hifas se desarrollan más allá del suelo que circunda la raíz, trascienden la rizósfera y transportan nutrimentos directamente a la planta; por ello, resulta fundamental entender no sólo la colonización intrarradical, sino también la extrarradical.

Dos de las funciones más relevantes del micelio externo son la búsqueda y absorción de nutrimentos minerales, y la relación que establecen las hifas extrarradicales con su entorno a través de la cual puede aumentar la porosidad del suelo, así como su agregación.

El objetivo del presente trabajo fue determinar los porcentajes de colonización intrarradical y extrarradical por HMA (totales y por estructura) en una selva alta perennifolia en Los Tuxtlas, Veracruz, en tres ambientes (selva, claro y potrero) durante dos estaciones climáticas (lluvias y secas). Se utilizaron métodos de extracción de micelio para suelos arcillosos y con abundancia en materia orgánica. Mediante un análisis de varianza, se determinaron las diferencias significativas entre los tratamientos; además, mediante el coeficiente de Pearson, se analizó si existía una correlación entre las raíces finas y los porcentajes de colonización tanto intrarradical como extrarradical, y entre la concentración de nutrimentos con las raíces finas y los porcentajes de colonización.

Para la colonización intrarradical total, en cada ambiente se registró un mayor porcentaje en el claro, seguido por la selva, y por último, el potrero (58.60, 42.5 y 15.2%, respectivamente). Por otra parte, se observó que la colonización extrarradical total tuvo el valor más alto en el claro, seguido de la selva y el potrero (157.19, 123.5 y 51.4 mm/g, respectivamente).

Con respecto a las temporadas climáticas, se observaron diferencias significativas en los dos tipos de colonización. La colonización intrarradical fue mayor en secas que en lluvias en todos los ambientes. Asimismo, la colonización extrarradical fue más alta durante la sequía en el claro y la selva, mientras que en el potrero fue mayor en lluvias.

No se encontraron correlaciones significativas entre los porcentajes de raíces finas con los dos tipos de colonización, ni tampoco entre las concentraciones de fósforo (P) y carbono (C) del

suelo con los porcentajes de colonización; la única correlación significativa fue entre las concentraciones de nitrógeno (N) y la colonización intrarradical y extrarradical.

Al tener los claros una mayor disponibilidad de recursos esenciales como la luz, la acumulación de materia orgánica y mayor ingreso de agua con respecto a la selva, es el más colonizado, mientras que el potrero, al ser el microambiente más limitado en recursos y más expuesto a disturbios, fue ahí donde se encontraron los menores porcentajes de micelio extrarradical e intrarradical.

El aumento de la colonización en la estación de secas indica una disyuntiva en el hongo que tiene que invertir su energía hacia la colonización intrarradical, consolidando la relación con la planta, de esta forma en lugar de asignar recursos para explorar el suelo con el riesgo de un estrés hídrico aumenta la colonización intrarradical, pero al mismo tiempo para que esta simbiosis ocurra, se requiere de nutrimentos, por lo que la colonización extrarradical también aumentó en la estación de secas, para lograr tener estos recursos para el intercambio por C. Estos resultados son consistentes con el hecho de que las estructuras que presentaron los mayores porcentajes fueron las hifas las cuales pueden actuar eficientemente como propágulos.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la colonización micorrícica arbuscular

El término micorriza fue usado por primera vez para describir la asociación mutualista que se presenta entre las plantas y los hongos. Las asociaciones micorrícicas son cosmopolitas y generalistas ya que se encuentran en la mayoría de los hábitats naturales y están presentes en casi todos los grupos de plantas. Estos simbiontes pueden ser facultativos u obligados y, dependiendo del ambiente y de las especies de plantas interactuantes (Figura 1), se pueden encontrar diferentes tipos de micorrizas (Guadarama-Chávez *et al.* 2004).

Un grupo de hongos muy importante por su abundancia son los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), los cuales no sobrepasan las 200 especies (Walker 1992) y están agrupados dentro del Phylum Glomeromycota (Morton y Redecker 2001). Estos hongos se establecen en el sistema radical de aproximadamente 85% de las especies vegetales (Morton y Redecker 2001), formando la micorriza arbuscular.

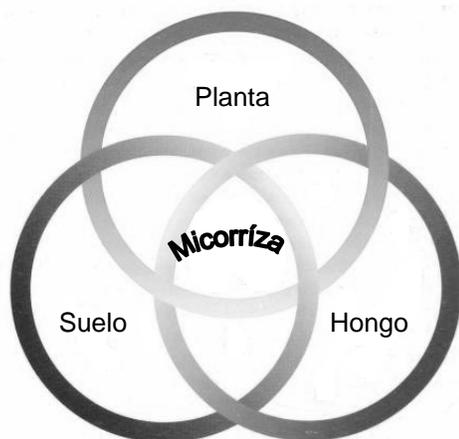


Figura 1. Las asociaciones micorrícicas se componen de la interacción de tres elementos, que son la planta, el hongo y el suelo (tomado de Brundrett *et al.* 1996).

Al igual que en otros tipos de micorrizas, en la micorriza arbuscular la planta proporciona al hongo heterótrofo productos derivados de la fotosíntesis (carbohidratos), además de un hábitat. A cambio, el micobionte facilita la absorción de nutrimentos minerales y agua obtenidos como consecuencia de su mayor accesibilidad a recursos distantes del sistema radical, lo que le permite a la planta ser más resistente a los cambios en la acidificación del suelo, derivados de la presencia de minerales como el

azufre (S), el magnesio (Mg) y el aluminio (Al). Lo anterior aumenta la longevidad de la raíz de la planta, así como su crecimiento y supervivencia (Bago *et al.* 2000).

La colonización inicia con el contacto de hifas infectivas producidas por propágulos fúngicos, ya sean esporas viables, micelio extrarradical o fragmentos de raíz colonizados. Al entrar en contacto con la raíz de un hospedero se forma un apresorio, la hifa penetra en la raíz y se

extiende de manera radial por la epidermis y exodermis (Figura 2). Así, se desarrollan estructuras como las hifas inter e intracelulares, que son filamentos tubulares que penetran la epidermis radical para iniciar la colonización. Al llegar las células al córtex, las hifas se diferencian dando lugar a los arbuscúlos, que son formaciones dicotómicas con apariencia de un pequeño árbol, que son consideradas las estructuras donde ocurre el intercambio bidireccional de nutrientes; por otra parte, se pueden formar vesículas, que son estructuras de almacenamiento de nutrientes, y esporas (Bago *et al.* 2000).

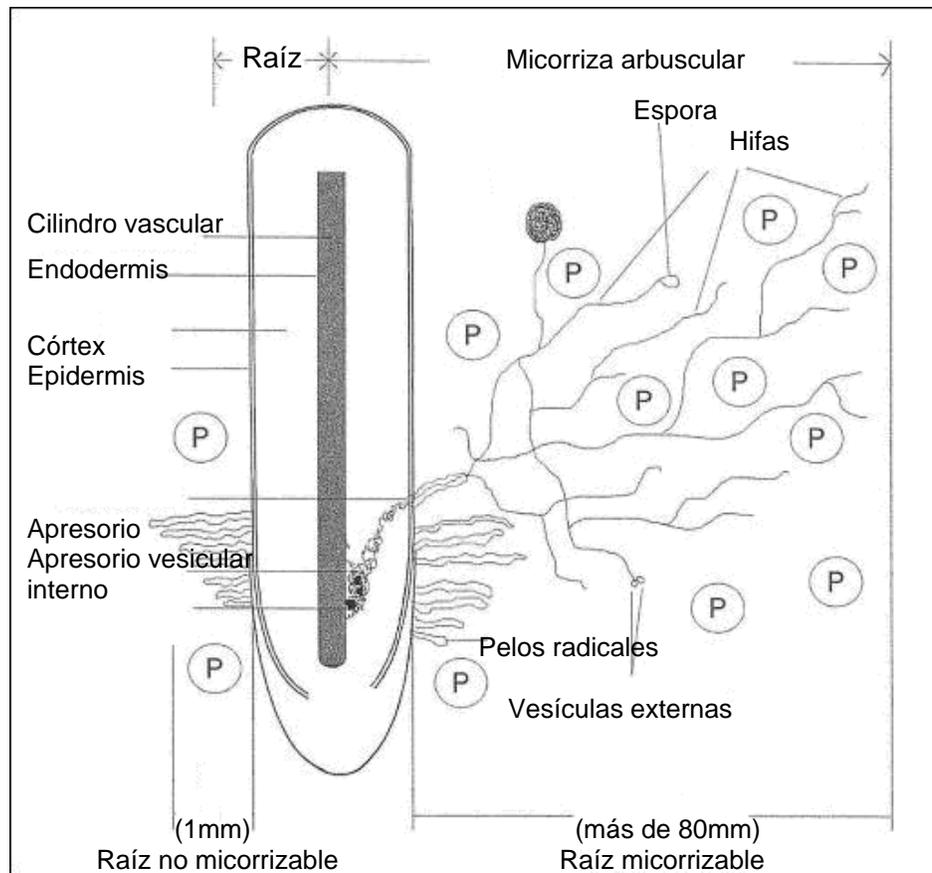


Figura 2. Colonización por hongos micorrizógenos arbusculares. El apresorio entra a la epidermis de la raíz iniciando la colonización por medio de las hifas intrarradicales extendiéndose por todo el córtex; las hifas extrarradicales se desarrollan a través de toda la rizósfera llegando a las moléculas de nutrientes (en este caso de fósforo, P) y agua, absorbiéndolas para hacer el intercambio bidireccional dentro de los arbuscúlos (tomado de EDIS 2009).

El desarrollo y crecimiento de las hifas están determinados por el hongo que coloniza; es decir, el tiempo de colonización y su porcentaje varían, así como la biomasa del hongo de acuerdo al género y especie de HMA de que se trate. Hart y Reader (2002) hicieron un experimento con pastos y hierbas (*Plantago* sp y *Poa* sp.), con tres familias diferentes de HMA (Glomaceae, Acaulosporaceae, Gigasporaceae), para observar las diferencias en la forma de colonización. Los Glomaceae tienen una colonización menos duradera, pero más abundante que las familias Acaulosporaceae y Gigasporaceae, además de que colonizan en mayor porcentaje a la planta que al suelo. En cambio, las familias Acaulosporaceae y Gigasporaceae tienen una colonización más duradera, pero su biomasa no es tan abundante como la de los Glomaceae. Los hongos del género *Acaulospora* colonizan en mayor proporción la raíz del hospedero, mientras que los de la familia Gigasporaceae colonizan en su mayoría al suelo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferencias de colonización entre tres familias de HMA (tomado de Hart y Reader 2002).

| Características fúngicas | Glomaceae | Acaulosporaceae | Gigasporaceae | |
|---|------------|-----------------|---------------|-----|
| Tiempo de colonización (semanas) | 4 | 6-8 | | |
| Colonización radical (%) | 20.6-84.8% | 3.2-73.4% | | |
| Biomasa fúngica en la raíz ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco de raíz) | 1.74-4.64 | 0.82-1.41 | | |
| Concentración de los porcentajes relativos de colonización | Raíz | +++ | +++ | + |
| | Suelo | + | + | +++ |

Después de la colonización intrarradical se inicia la colonización extrarradical, completando el ciclo vital de los HMA, permitiéndoles con ello crecer entre el sustrato (Harley y Smith 1983). El micelio es la estructura de los hongos micorrizógenos más conectada al suelo y está directamente relacionada con la absorción de nutrimentos, por lo que influyen en las propiedades del suelo. Estas redes de micelio proporcionan rutas para la transferencia del carbono (C) recibido de las raíces de la planta hospedera, así como de los nutrimentos tomados del suelo. Por otro lado, el micelio también transfiere sustancias nutritivas y C entre plantas entrelazadas por la misma red de micelial (Simard *et al.* 2002) (Figura 3).

En el suelo, los HMA presentan una extensa red de hifas integrada, por una parte, por las hifas de avance (Harley y Smith 1983) que son de paredes gruesas, grandes y con proyecciones angulares muy definidas; siguen la trayectoria de las raíces en el suelo y en algunos casos simplemente crecen a través de éste en busca de raíces. Estas hifas de avance, aunque también

absorben nutrimentos, su función primordial es de soporte y son base permanente de la red micelial (Sylvia *et al.* 1999).

Por otra parte, a partir de las hifas de avance se desarrollan las hifas exploradoras primarias, las que a su vez forman ramificaciones, dando origen a hifas exploradoras de órdenes superiores. Cuando la micorriza se establece y la hifa da por terminado su desarrollo, se forman poco después a partir del ápice unas estructuras ramificadas con apariencia de árbol que son las “estructuras ramificadas de absorción” (BAS, por sus siglas en inglés). Las hifas absorbentes son de paredes más finas y menores en tamaño, se desarrollan a partir de las de avance y se dividen dicotómicamente extendiéndose en el suelo; su escaso diámetro les permite explorar los poros más finos del suelo y su función primordial es la absorción de nutrimentos para transportarlos al hospedero (Bago *et al.* 1998, Sylvia *et al.* 1999).

La hifa extraradical constituye una importante forma de transporte de fósforo (P) lábil y otros nutrimentos a través del suelo desde zonas lejanas. La absorción es por translocación a las hifas, a diferencia del proceso de absorción por transporte pasivo que ocurre en las raíces. Las hifas finas pueden tomar más P, C o N de los poros del suelo que normalmente está inaccesible para las raíces o los pelos radicales, debido a su mayor relación área/volumen que les permite explorar intensamente un gran volumen de suelo (Sharma y Johri 2002). Así, entre más delgada sea la hifa, más fácil le será entrar a un mayor número de poros del suelo y llegar hasta las islas de nutrimentos (Sylvia *et al.* 1999). Puede ser que no haya diferencias claras entre la longitud y la eficiencia de la hifa (Smith *et al.* 2000), lo que en parte podría ser explicado por las diferencias propia de la especie entre las longitudes que puede llegar a tener el hongo micorrizógeno y las distancias de extensión de suelo que tenga que recorrer para llegar a la islas de nutrimentos (Schweiger y Jakobsen 2000).

La red de micelio extraradical permite el movimiento de sustancias nutritivas o de agua dentro de ésta. Varios estudios de laboratorio han demostrado el movimiento del C de una planta micorrizada a otra (Martins 1993, Watkins *et al.* 1996), pero ninguno ha demostrado la transferencia neta del nutrimento (Perry 1999) o de ningún movimiento de C transferido hacia las raíces (Waters y Borowicz 1994, Watkins *et al.* 1996). Aunque la capacidad de los hongos para absorber y proporcionar sustancias nutritivas y C a plantas unidas en gran parte haya sido poco explorada (Miller y Allen 1992), se sugiere que puede haber una ventaja neta de las plantas conectadas a la red, reduciendo la demanda de C por los HMA (Wilkinson 1998; Zabinski *et al.* 2002). Además, Fitter *et al.* (1998) demostraron que el grado de transferencia está positivamente correlacionado con la abundancia de vesículas y no con la abundancia hifal.

Otra propiedad del micelio extrarradical es la formación de agregados en el suelo. Estos hongos producen una glicoproteína llamada glomalina que presenta la capacidad de aglomerar las partículas de suelo, logrando una mayor estabilidad estructural ya que los agregados están directamente relacionados con la longitud de las hifas (Lovelock *et al.* 2004) (Figura 4). Estimaciones recientes sugieren que los HMA constituyen más del 50% de la longitud total fúngica en algunos suelos (Rillig *et al.* 2002), pueden representar más del 20% de la biomasa microbiana total en pastizales y praderas (Miller y Kling 2000), y constituir más del 30% de la biomasa microbiana en suelos arenosos (Olsson y Wilhelmsson 2000). Además de su contribución a la fracción viva y la estabilidad estructural que brinda la glomalina, su acumulación en el suelo contribuye a mantener una cantidad sustancial de C orgánico en éste. Por ejemplo, Miller y Kling (2000) sugieren que el 15% del C orgánico que se encuentra en el suelo de praderas es adicionado por los HMA; esto ocurre de modo similar en el suelo de la selva alta perennifolia, donde la mayoría de los árboles son micotróficos (Rillig *et al.* 2001).

Las micorrizas unen la parte biótica con la parte geoquímica del ecosistema (O' Neil *et al.* 1991), por lo que podemos considerar que desempeñan un papel importante en el acortamiento de los ciclos biogeoquímicos. Por lo general, un ecosistema maduro se caracteriza por tener un sistema que tiende a desarrollar mecanismos para conservar los nutrientes que son atrapados por las arcillas y las partículas del suelo. En este escenario, el micelio extrarradical se distribuye en el suelo y absorbe sustancias nutritivas y los canaliza rápidamente a la planta.

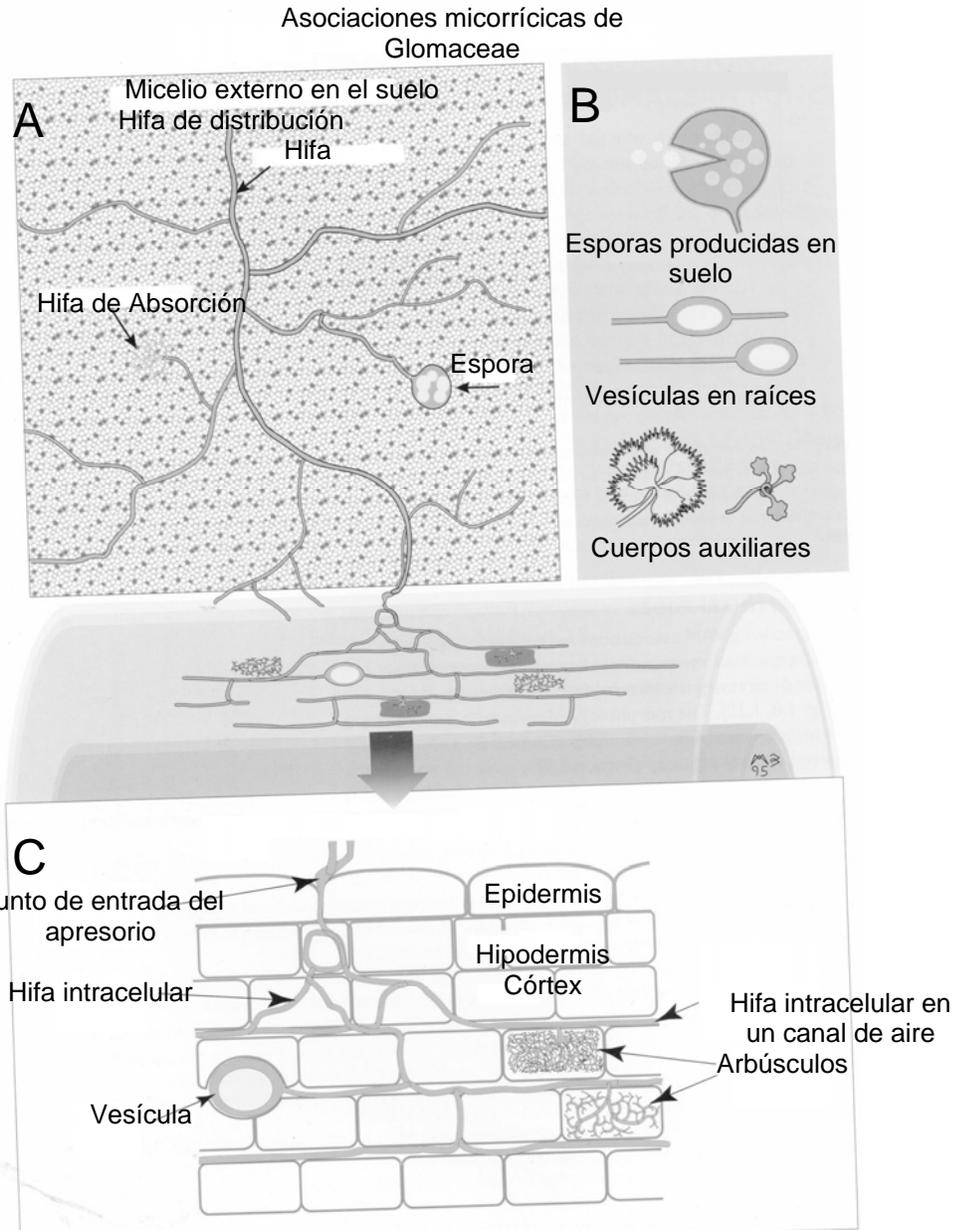


Figura 3. Principales estructuras de los HMA (tomado de Brundrett *et al.* 1996).

- A. Estructuras de los HMA que se desarrollan en suelo.
- B. Estructuras que se forman en suelo y/o raíces
- C. Estructuras que se forman en raíz

En resumen, Simard *et al.* (2002) plantearon seis efectos importantes que se pueden presentar sobre las comunidades y ecosistemas por la presencia de los HMA: a) la red micelial ayuda en el establecimiento de plántulas cerca de plantas "maduras", permitiendo a las plántulas colonizarse más rápidamente al entrar en contacto con la red micelial; b) la recuperación de especies después de una perturbación, lo que es particularmente importante cuando el disturbio es impredecible; c) reducen la intensidad de la competencia y promueven la diversidad de especies por transferencia de C o nutrientes entre las plantas conectadas a la red micelial; d) afectan las demandas nutritivas del hongo, a través de las relaciones entre la fuente y el almacenamiento de recursos; e) reducen las pérdidas de nutrientes de los ecosistemas a través del almacenamiento de nutrientes en la biomasa viva y, f) aumentan la productividad, estabilidad, y el mantenimiento de los ecosistemas.

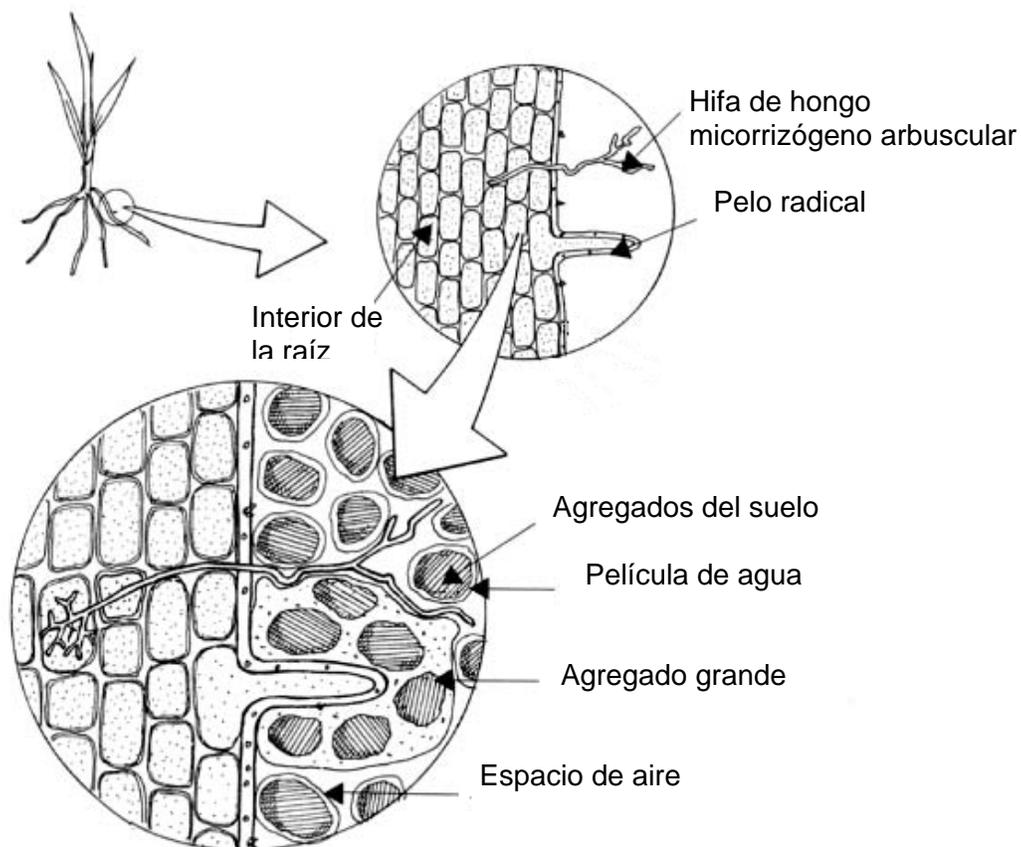


Figura 4. Las hifas extrarradicales promueven la formación y estabilización de agregados en el suelo. (tomado de Sustainable Agriculture Research and Education, SARE, 2009).

1.2 Factores que afectan la colonización

Treseder y Allen (2002) propusieron un modelo para analizar la relación nutriente/colonización: cuando existe alta concentración de nutrientes el hongo recibirá poco carbono de las plantas, pero si existe baja concentración, las plantas estarán limitadas en N o P y asignarán mayor cantidad de carbono a los HMA, ya que en el momento en que la planta se ve limitada para absorber nutrientes por sí sola, invierte en la simbiosis con los hongos micorrizógenos intercambiando éstos por C; sin embargo, cuando la concentración de nutrientes es alta la planta no tiene que invertir C en la relación mutualista, ya que por sí sola puede cubrir las necesidades de nutrientes y agua.

Uno de los factores limitantes sobre todo en las selvas altas perennifolias, es la concentración de P que existe en el suelo, de la cual dependerá la colonización por HMA (Kiers *et al.* 2000); esto es, si hay poca disponibilidad de P, ello promoverá la asignación de recursos por parte de la planta para promover el desarrollo de los HMA. En un experimento con plántulas de dos especies micorrízicas *Dicorunia guianensis* y *Eperua falcata* en tres diferentes concentraciones de P, luego de crecer durante nueve meses agotaron el P adicionado a las muestras de suelo. Sin embargo, *E. falcata* no mostró una respuesta a las limitaciones de P en el suelo, ya que no hubo ni crecimiento ni la absorción de P que se esperaba. En este experimento, de Grandcourt *et al.* (2004) mostraron que la eficiencia con que el P es absorbido por el micelio extraradical aumenta conforme la colonización se incrementa.

Otro de los nutrientes importantes que puede disminuir los niveles de colonización por HMA es el nitrógeno (N). Si bien en la selva de Los Tuxtlas se ha reportado que las reservas de N total son adecuadas (5mg g^{-1}) (Sommers-Cervantes *et al.* 2003), y que las concentraciones de N en el suelo mineral en una cronosecuencia sucesional fueron relativamente estables (Hughes *et al.* 1999), el N puede disminuir o aumentar la colonización de los HMA dependiendo de la especie de hongo. Por ejemplo, Treseder y Allen (2002) demostraron que *Glomus* tuvo mayor colonización en sitios con altas concentraciones de N ($14.41 \pm 7.20 \mu\text{g}$ por bolsa por día⁻¹), con respecto a sitios con baja concentración ($3.31 \pm 1.56 \mu\text{g}$ por bolsa por día⁻¹), mientras que *Scutellospora* redujo su abundancia de esporas y colonización con fertilizaciones extras de N.

Además de los nutrientes, otro factor que afecta la colonización de los HMA es el pH. Uno de los aspectos más importantes deriva del hecho de que las plantas pueden absorber los minerales disueltos en el agua, mientras que la variación del pH modifica su grado de solubilidad. El pH neutro es de los más favorables para el mejor desarrollo de los HMA (Smyle *et al.* 1973). Por ejemplo, el aluminio (Al) y el manganeso (Mn) son más solubles a un pH bajo, y cuando esto ocurre, pueden ser absorbidos por las raíces. Modificaciones de pH en el suelo provocan cambios en la solubilidad del P y esto, a su vez, afecta la absorción del P por medio de los HMA.. Graw

(1979) observó que en dos especies de la familia Asteraceae la absorción de P se afectó por la acidez del suelo; notó que a un pH de 5.6 las plantas no micorrizadas tenían una tendencia de absorción baja, mientras que modificando el pH a 4.3 en plantas micorrizadas, se estimuló la absorción de P del suelo. La acidificación del suelo puede deberse a los exudados de las raíces y su combinación con la respiración de la microbiota (Duods y Schenck 1990).

Una de las ventajas que los HMA proporcionan a la planta, es una resistencia a la poca disponibilidad de agua. Esto es porque en las plantas micorrizadas se produce un aumento del contenido de agua, debido a un aumento de la conductividad hidráulica de la planta o a una disminución de la resistencia al flujo de agua a través de ella. Éste puede ser un efecto indirecto por los cambios en la estructura del suelo a través de la actividad de las hifas extrarradicales (Augé 2001), ya que Cooper (1984) señala que existe una mayor absorción de agua a través de la red de hifas externas de los HMA, la cual se extiende más allá de la zona a la cual tiene acceso directo el sistema radical de la planta. Al-Karaki *et al.* (2004) hicieron varios experimentos con plantas de maíz colonizadas y no colonizadas, encontrando mayor colonización en plantas cultivadas bajo condiciones de no sequía, que en condiciones de sequía. Por otro lado, Davies *et al.* (1992) observaron, en un estudio en invernadero con plantas de pimienta en ciclos de sequía y no sequía, que después de los tratamientos de aclimatación de sequía mejoró la resistencia a la baja disponibilidad de agua y se estimuló el desarrollo de las hifas extrarradicales y la adhesión de partículas del suelo en las raíces de plantas micorrizadas. Las plantas micorrizadas expuestas a éstos tratamientos mantuvieron relativamente altos los niveles de potencial hídrico en las hojas, turgencia, potencial de agua y flujo de transpiración.

Otro factor importante que favorece la colonización micorrícica es la temperatura, ya que se ha reportado que a temperaturas de 10°C, la colonización en maíz es de tan sólo el 8%; además se ha reportado que las bajas temperaturas inhiben la germinación de las esporas que están en el suelo y, por lo tanto, la subsecuente colonización (Al-Karaki *et al.* 2004). La temperatura que favorece el desarrollo del simbionte está alrededor de los 30°C, cuando las temperaturas sobrepasan los 30°C decae la colonización por HMA, y por arriba de 40°C por mas de 24 hrs el crecimiento es nulo (Bendavid-Val *et al.* 1997). La radiación solar que llega al suelo es sólo una causa temporal de la disminución de la colonización de los HMA, así como de su viabilidad.

La radiación solar es considerada uno de los factores físicos más importantes que limitan los porcentajes de colonización. La luz controla tanto el crecimiento de las plántulas como la germinación de semillas. Además, estudios hechos por Smith (1980) muestran que a baja intensidad de luz, la longitud y el crecimiento de las raíces secundarias declinan debido a las reducidas proporciones de carbono que se tienen que repartir entre las raíces y el resto de la

planta (Whitbeck 2001). Se ha observado que a baja radiación no se producen tantos exudados en las raíces de las plantas que atraen químicamente a las hifas de los HMA, provocando una baja concentración de compuestos carbonatados por las bajas tasas fotosintéticas, lo cual a su vez inhibe la colonización por HMA (Hayman 1974). Según lo encontrado por Gehring (2003), la colonización por HMA disminuye en bajas intensidades de luz en plántulas de *Cryptocarya mackinnoniana* en una selva alta perennifolia.

1.3 La selva y su dinámica de regeneración

Las selvas altas perennifolias son sistemas notablemente diversos y dinámicos. Es común encontrar en una superficie de una hectárea más de 100 árboles con un diámetro del tronco a la altura del pecho mayor a 10 cm, y hasta un total de entre 50 y 300 especies, y la intensa dinámica de reemplazamiento de los árboles puede demostrarse con el hecho de que se renuevan las especies en lapsos de 50 a 400 años (Martínez-Ramos 1994).

La selva alta perennifolia es frecuentemente alterada de manera natural por el recambio de árboles; a este proceso se le llama regeneración, proceso natural que inicia cuando los árboles de edad madura o partes de éstos han caído, abriendo un espacio en el dosel de la selva (Figura 5). En estos huecos (conocidos como claros) se producen fuertes cambios ambientales con respecto a los sitios de selva donde el dosel o el subdosel no se han perdido (intensidad de luz, humedad, temperatura, etc.) que estimulan el crecimiento y desarrollo de especies demandantes de luz (DL); este proceso con el tiempo termina en el cierre del claro (Martínez-Ramos 1994).

Grubb (1977) indica que en la regeneración de los claros influyen varios factores como el tamaño y forma del claro, los rasgos de historia de vida de las plantas, el estadio de crecimiento de la planta, la edad y orientación del claro y la altura y el tipo de vegetación que circundan el claro. La frecuencia con que ocurre la apertura de un claro, depende de algunos factores asociados al terreno como la topografía y las características físicas del suelo, así como al régimen climatológico, como, por ejemplo, la intensidad y frecuencia de huracanes, tormentas eléctricas y ciclones, o incluso a la mortalidad natural de los árboles (Martínez-Ramos 1994). Estos factores son determinantes en la selección de especies que cerrarán el claro y, por lo tanto, de la estructura y dinámica en ese espacio de selva.

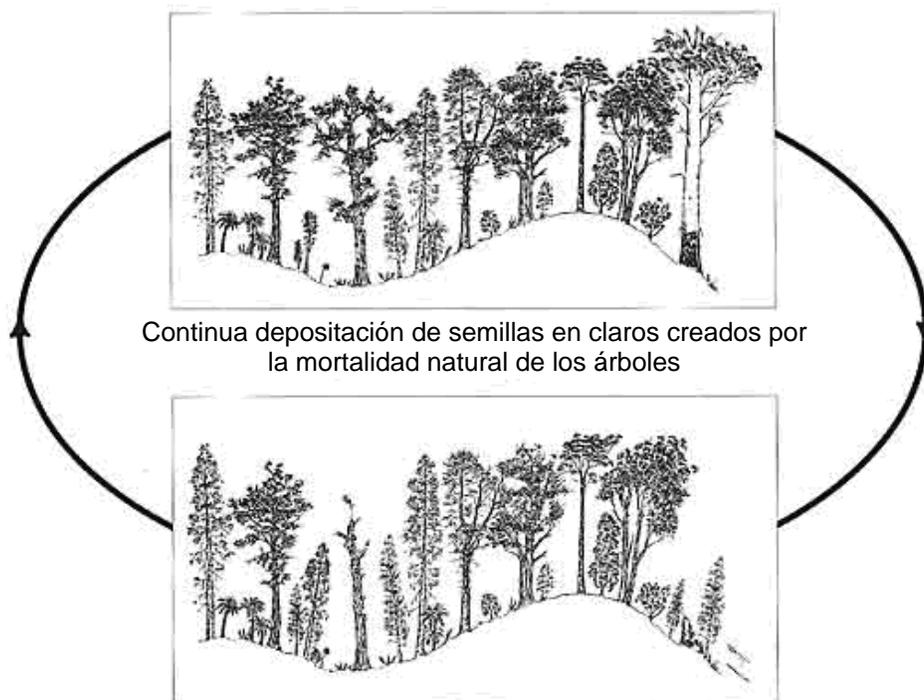


Figura 5. Regeneración natural de la selva. Es un proceso que ocurre cuando partes de un individuo o un individuo en su totalidad cae, abriendo un claro dentro de la vegetación; éste espacio es ocupado por la germinación y crecimiento de nuevos individuos (tomado de Forest Education Fundation 2009).

La regeneración de los claros también va a depender del tamaño que tengan éstos al momento de su formación; en los claros pequeños (menos de 100 m^2) es más probable que ocurra el cierre del dosel ya sea por el crecimiento lateral de los individuos y/o por crecimiento de plántulas ya establecidas en el suelo (Martínez-Ramos 1994). Por otro lado, los claros de mayor tamaño (mas de 100 m^2) se regeneran, principalmente, por los bancos de semillas que están en el suelo de la selva; de este modo algunos árboles de especies demandantes de luz (DL) emergen del banco, saliendo de su etapa de latencia al experimentar un fuerte aumento de recursos lumínicos (Martínez-Ramos 1994).

1.4 Deforestación y fragmentación de la selva

En general, debido a la deforestación, la cobertura de la selva va cambiando disminuyendo al paso del tiempo. Este proceso está vinculado estrechamente con los cambios en el uso del suelo, determinados por el aprovechamiento de los recursos del ambiente (Franklin *et al.* 2002). De acuerdo a Velázquez *et al.* (2000) las pérdidas anuales de vegetación natural van del 1 al 10% de selva. La selva alta perennifolia es uno de los ecosistemas más afectados, en la región de “Los

Tuxtlas”, Veracruz, se reportó que las tasas anuales de deforestación eran de 4.3% (Dirzo y García 1992). Por esta razón, el paisaje, originalmente ocupado por selva alta perennifolia, ahora está conformado por un mosaico formado por varios elementos, como fragmentos de selva, cercas vivas, árboles aislados, acahuales y potreros. En particular, estos últimos poseen una estructura y composición influenciadas por la presencia de árboles remanentes, distribuidos a lo largo y ancho de los potreros (Guevara *et al.* 1994).

La deforestación trae como consecuencia una fragmentación, que rompe las grandes zonas de extensión de vegetación arbórea y las convierte en pequeñas unidades, a veces aisladas, o conectadas por vegetación remanente original en distintos estados de regeneración (Franklin *et al.* 2002). Estos fragmentos se encuentran inmersos en una matriz compleja junto con cultivos y potreros, quizá el principal uso del suelo de la región. La riqueza florística y estructural de la vegetación de los potreros, está estrechamente relacionada con la frecuencia y abundancia de árboles remanentes y cercas vivas que en ellos existen y de la fauna propia de la región que pueda utilizarlos como pasos y refugios entre fragmentos de selva.

Dentro de los potreros se pueden mencionar tres categorías: potreros con árboles, sin árboles y con cultivos pequeños (Guevara *et al.* 1994). Se componen de dos tipos de pastos: el grama (*Paspalum sp.*) y el estrella (*Cynodon plectostachys*). El pasto grama se presenta con la sola presencia del ganado y el ramoneo, mientras que el pasto estrella es introducido (Castillo-Campos y Laborde 2004). Guevara *et al.* (1994) y Lira (2003) reportan una mayor riqueza de especies en pastos grama, incluidas plántulas de especies leñosas; para estos autores los pastos nativos que dominan los pastizales de grama son considerados como especies ruderales o de sucesión temprana, que favorecen el establecimiento y crecimiento de otras especies nativas de la zona.

En un suelo compactado por la actividad del ganado, como ocurre en los potreros, la densidad del suelo aumenta y la porosidad se reduce. Esto resulta en la degradación de la estructura del suelo y en la reducción de la humedad, en el aumento de la erosión del suelo y la reducción del crecimiento radical con lo que, eventualmente, disminuye el crecimiento vegetal (Velázquez *et al.* 2000).

2 ANTECEDENTES

Guadarrama y Álvarez-Sánchez (1999), en un estudio realizado en la selva alta perennifolia de Los Tuxtlas, Veracruz, en diferentes estaciones (lluvias, nortes y secas) y diferentes ambientes (claros, dosel cerrado), no encontraron diferencias significativas en la abundancia de esporas de HMA entre los claros y el dosel cerrado; sin embargo, durante la estación seca la abundancia de las esporas aumentó, mientras que la producción de raíces finas disminuyó. Además, en la época de nortes (septiembre a febrero) las esporas disminuyeron en abundancia y aumentó la colonización. Los HMA presentan diferencias en los porcentajes de colonización entre los distintos fragmentos y ambientes del paisaje de la selva, debido a los factores ambientales que ejercen influencia sobre los hongos o a los cambios de uso del suelo.

Otros estudios en selva alta perennifolia (Ramírez-Gerardo *et al.* 1997, Zhi-Wei *et al.* 2001, Núñez-Castillo y Álvarez-Sánchez 2003), sugieren que existen cambios en la distribución espacial y temporal de esporas, debido a los cambios en la estructura del suelo, la perturbación y los cambios microclimáticos del suelo, los cuales modifican la densidad de esporas y la cantidad de inóculo presente en el suelo (Luna, 2009).

La estacionalidad en la actividad de los hongos fue observada en los trabajos de Bohrer *et al.* (2004), en su estudio en manglares y pantanos, en donde demostraron que las estaciones tienen un impacto sobre los porcentajes de colonización. En muchos ecosistemas terrestres los cambios estacionales en la colonización de HMA muestran un comportamiento que está correlacionado con la fenología de las plantas y los cambios en la disponibilidad de P (Rabatin 1979, Brundrett 1991). Brown y Bledsoe (1996) y Carvalho *et al.* (2001) señalaron que la dinámica de la colonización refleja la fenología de la planta, ya que los HMA le confieren ventajas a las plantas del pantano durante ciertas etapas de su ciclo de vida; así, en secas, los porcentajes de colonización en los pantanos son bajos, a diferencia de la estación de lluvias en que aumentan. Estos estudios sugieren que los HMA son tolerantes a porcentajes altos de humedad en el suelo y a condiciones de alta cantidad de agua.

Por otra parte, Van Hoewyk *et al.* (2001) reportan que la colonización por HMA se eleva en algunas áreas que experimentaron periodos de sequía estacional, apoyando con ello la especulación de que una capa freática fluctuante podría aumentar la colonización, ya que el agua proporciona la aireación periódica que el suelo necesita.

Muchos cambios en la colonización pueden ocurrir por el rápido crecimiento de las raíces o bien de las plantas durante periodos en que la temperatura y la humedad son favorables; estos cambios son graduales en muchas especies que crecen en ecosistemas naturales (Brundrett

1991). Se ha encontrado que las redes de hifas de HMA son un propágulo importante durante la época de secas, y que los suelos que tienen redes hifales son menos tolerantes al disturbio, con respecto a suelos en los cuales las esporas del HMA son comunes (Jasper *et al.* 1991). Por otro lado, Brundrett y Abbott (1994) hicieron un análisis sobre cómo las variaciones estacionales afectan la capacidad de los propágulos de los HMA para formar asociaciones en hábitats naturales en un bosque de eucalipto, en donde los veranos son secos y calientes, y los inviernos fríos y lluviosos; en su estudio compararon plantas nativas del bosque, tréboles y sorgo, a lo largo de varios muestreos en un año, mostrando que durante los periodos secos los HMA tienen una capacidad similar para formar micorrizas, que cuando el suelo está húmedo. Ellos explican este comportamiento en función de la existencia de una red de hifas que está presente en el suelo a lo largo del año, ya que no existen pruebas de que el inóculo de este tipo esté inactivo durante largos periodos de tiempo.

Otro factor que afecta la colonización de HMA, además de la estacionalidad, son los cambios ambientales generados por la apertura de claros durante la regeneración natural. Como ya se ha mencionado antes; los claros tienden a tener una colonización mayor por los cambios microambientales al momento de su apertura, favoreciendo tanto el desarrollo de especies DL, como el incremento de los porcentajes de colonización de los HMA. Núñez-Castillo y Álvarez-Sánchez (2003) encontraron que los porcentajes totales de colonización, asociados a la palma *Astrocaryum mexicanum* en una selva alta perennifolia, registraron los valores más altos en los claros, así como también los porcentajes de las hifas y las vesículas; sin embargo, los arbusculos registraron los mayores porcentajes de colonización en la selva con dosel cerrado, en el cual se supone hay una mayor competencia por recursos.

Una causa más que afecta la colonización es el cambio en el uso del suelo, ya que la creación de potreros y cultivos constituye una alteración drástica que repercute en la reducción del número de especies y esto, a su vez, está asociado directamente con la diversidad de HMA (Varela *et al.*, en preparación). Jasper *et al.* (1987) observaron un cambio en la composición de especies de HMA después de la perturbación de algunos sitios en Australia, mientras que los sitios sin vegetación presentaron pocos o ningún propágulo. En el caso de la selva alta perennifolia, las zonas más conservadas tienen mayor colonización y mayor diversidad de hongos con respecto a los pastizales o potreros aledaños (Núñez-Castillo 2006). En un estudio hacia el sur de la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas, en localidades con diferente cobertura vegetal original, Varela *et al.* (2008) observaron cambios en la diversidad de especies de HMA de acuerdo a cambios en el uso del suelo, la cual tendió a aumentar en sitios cultivados.

El pastoreo intensivo puede reducir seriamente la persistencia de los HMA por los altos niveles de compactación, lo que provoca que las hifas no logren pasar más allá de los bloques que

se forman de materia orgánica y partículas de suelo (Ingham y Wilson 1999, Nuñez-Castillo 2006). Las hifas extrarradicales son el principal inóculo de los HMA en el suelo (Sylvia 1992), por lo que dichas alteraciones separan a los HMA del hospedero reduciendo la probabilidad de encontrarse, además de evitar que las hifas exploren en sitios alejados de la planta.

Considerando lo anterior, en este trabajo se han planteado las siguientes preguntas:

¿Es posible que los porcentajes de colonización intrarradical y extrarradical cambien entre los diferentes ambientes naturales de la selva?

¿Existirá una relación estacionalidad-colonización intrarradical y estacionalidad-colonización extrarradical de HMA?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar la variación espacial y estacional de la colonización intrarradical y extrarradical por hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en tres diferentes ambientes derivados de una selva alta perennifolia.

3.2 Objetivos particulares

- A. Caracterizar los cambios en el micelio intrarradical y extrarradical de HMA en tres diferentes ambientes (selva, claro y potrero).
- B. Determinar los cambios en porcentaje de micelio extrarradical e intrarradical de HMA en diferentes estaciones (lluvias y secas) para cada uno de dichos ambientes.
- C. Analizar si los cambios en los porcentajes de colonización están relacionados con las concentraciones de P, N y C en el suelo, y con la densidad de raíces finas.

4 HIPÓTESIS

- A. Se espera una mayor colonización micorrícica intrarradical en los claros, donde ocurre la renovación natural del dosel, seguido por la selva y por último, el potrero, ya que el cambio de uso de suelo disminuirá la disponibilidad de micelio y, por lo tanto, la colonización.
- B. Se presentará mayor colonización de micelio extrarradical en claro, seguido de selva, y por último el potrero, ya que en éste las condiciones de cambio de uso de suelo limitarán las posibilidades de crecimiento y dispersión del micelio.
- C. Con respecto a la estacionalidad, se registrará una mayor colonización en el micelio intrarradical en secas que en lluvias, mientras que en el micelio extrarradical habrá mayor colonización en lluvias que en secas. Ello debido a que el micelio fúngico se desarrolla durante la época de lluvias, mientras que en la sequía proliferan las esporas que son estructuras de resistencia.
- D. Las concentraciones de N y P tendrán una influencia mayor con los porcentajes de colonización, ya que la planta necesita estos nutrimentos para sobrevivir y desarrollarse y ello puede ejercer influencia sobre la proliferación de los HMA. A menor concentración de P y N, se espera mayor asignación a la producción de micelio.

5 MÉTODOS

5.1 Sitio de estudio, la Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”

5.1.1 Localización Geográfica

La Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas” está ubicada en la llanura costera del sur del Golfo de México, prácticamente sobre la costa. Se localiza aproximadamente entre los 18°05' y 18°45' latitud norte y 94°30' y 94°35' de longitud oeste (Figura 6). Cuenta con un área de 155, 122 ha divididas en 125, 403 ha de zona de amortiguamiento que posee tres zonas núcleo en el Volcán de San Martín y en el de Santa Marta (Castillo-Campos y Laborde 2004).

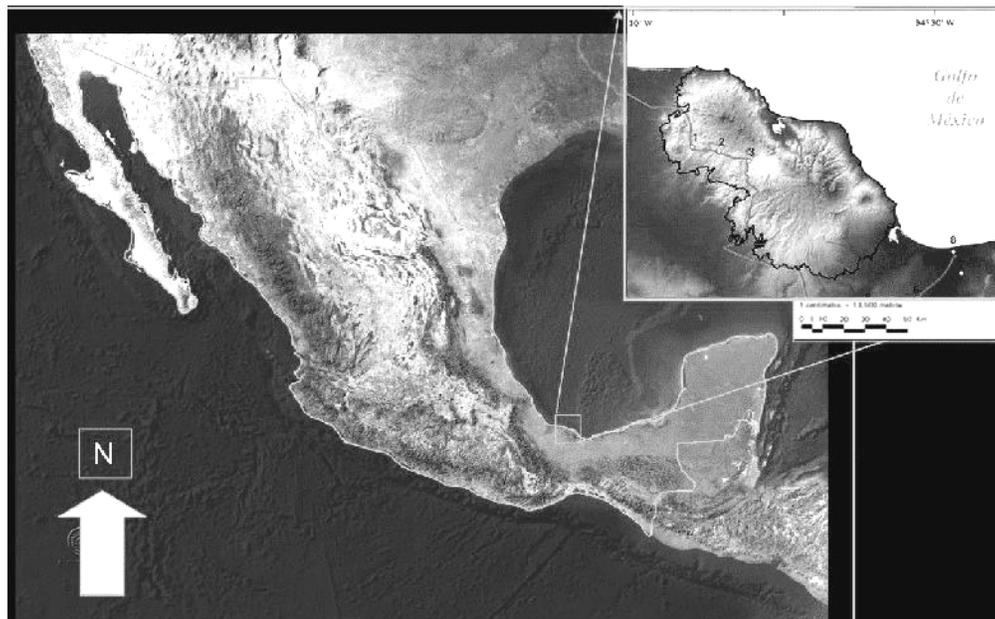


Figura 6. Imagen de la Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas” (Tomada de Guevara *et al.* 2004).

5.1.2 Vegetación

Uno de los nueve tipos de vegetación de la Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas” es la selva alta perennifolia (SAP). Presenta una notable variedad de árboles de diversas tallas, lianas, trepadoras, herbáceas, epífitas, palmas, arbustos, hierbas umbrófilas y árboles estranguladores (Castillo-Campos y Laborde 2004).

El estrato arbóreo alcanza una altura de entre 30 a 35 m con individuos ocasionales con una altura por arriba de los 40 m. Las familias más importantes de acuerdo al número de especies son Leguminosae, Moraceae, Rubiaceae y Lauraceae. Algunos de los representantes del estrato medio y bajo son: *Pseudolmedia oxyphyllaria*, *Cupania glabra*, *Pleuranthodendron lindeni* y *Pimenta dioica*. En el sotobosque abundan las palmas especialmente *Astrocaryum mexicanum* que es la especie más abundante dentro de la selva (Castillo-Campos y Laborde 2004).

En gran parte, los alrededores de la Reserva están convertidos en potreros o acahuales. Los potreros, son de dos tipos: de pastos nativos con *Cynodon dactylon* y de pastos cultivados, principalmente *Cynodon plectostachyus*. La mezcla de ranchos privados, colonias agrícolas o ganaderas y ejidos, ha dado lugar a una compleja interrelación entre ellos (Castillo-Campos y Laborde 2004).

5.1.3 Clima

De acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por García (1964), los subtipos de clima mas extendidos por la región son los calidos-húmedos (Af y Am) (Soto y Gamma 1997). La temperatura media anual es de 24.3°C, con una máxima de 32.18°C y una mínima de 16.4°C, con precipitaciones promedio anuales de 4, 500mm; se trata de la región con mayor precipitación a lo largo del Golfo de México. Sin embargo, existen estudios en donde se ha visto que debido al gran porcentaje de evaporación que presenta la región, tiene una disminución de agua importante entre los meses de marzo y mayo (Moreno, 2010).

Existen tres estaciones climáticas: lluvias (junio a noviembre), secas (marzo a mayo) y nortes (diciembre a febrero) provocando precipitaciones invernales y descensos rápidos de temperatura. El mes más seco generalmente es mayo y los meses mas lluviosos van de agosto a noviembre (Soto y Gama 1997).

5.1.4 Suelos

Existe una notable variedad de tipos de suelo, determinada fundamentalmente por el origen volcánico, la edad de los materiales geológicos, la alta diversidad geomorfológica, las condiciones climáticas y los distintos tipos de vegetación de la sierra (Flores-Delgadillo *et al.* 1999). Las condiciones ecogeográficas que se establecen allí han dado origen a una diversidad importante de suelos. El sustrato de la sierra consiste principalmente de rocas ígneas (basalto y andesitas) mezclado con cenizas volcánicas.

Entre los grupos más importantes de tipos de suelo determinados por su extensión están los luviosoles y acrisoles con 34.2% de la superficie de la sierra, los andosoles con 21%, fozezems con 18% y vertisoles con 13%. Los suelos con textura arcillosa son los que predominan con 48.5% del total de los suelos. Los colores del suelo predominantes son el rojo, rojo amarillento y pardo oscuro, pardo grisáceo y pardo amarillento siendo éste el más común, lo que indica que existe gran cantidad de humedad y materia orgánica en el suelo (Campos 2004).

Con respecto a las propiedades químicas del suelo, el pH es ácido y va de 4.5 a 5.3, poseen un alto contenido de materia orgánica (MO); los valores de N total son muy bajos y van de 0.1% a 0.6% (Flores-Delgado *et al.* 1999). Las concentraciones de carbono orgánico son también bajas (< 6%) (Campos 2004) y las de P varían de 5 a 140%, con concentraciones de aproximadamente 107 Kg ha⁻¹ (Hughes *et al.* 1999).

5.2 Muestreo de campo y caracterización de los ambientes

El muestreo se llevó a cabo en los meses de abril (secas) y septiembre (lluvias) de 2006, para cada ambiente (selva, claro y potrero) con su respectiva réplica.

Se colocó una línea de 50 m evitando veredas; cada 10 m empezando del metro cero, se tomó una muestra compuesta de doce puntos de suelo alrededor del punto central, tomando los primeros 20 cm de profundidad (Sánchez-Gallen 1999) para coleccionar en total 1 kg por muestra. De esta forma, se obtuvieron seis muestras compuestas con su réplica, para tener un total de 12 muestras por ambiente, 36 por estación climática y un gran total de 72 muestras. Las líneas tenían una orientación que seguía la pendiente mayor en los potreros y en la selva, mientras que las muestras de los claros fueron tomadas al azar, cuando el terreno no permitía la óptima colocación de la línea (Figuras 7a y 7b).

Las muestras de suelo se colocaron en bolsas de plástico e inmediatamente en hielo para bajar la tasa metabólica del micelio extrarradical, evitar la degradación del micelio por la salida de agua y evitar pérdidas por depredadores de micelio extrarradical, como bacterias y micro artrópodos (Addy *et al.* 1997, Powers *et al.* 2005). Se separaron las raíces finas del suelo en el campo hasta su análisis en el laboratorio, en donde se pusieron a secar a temperatura ambiente, para empezar su tratamiento de tinción.

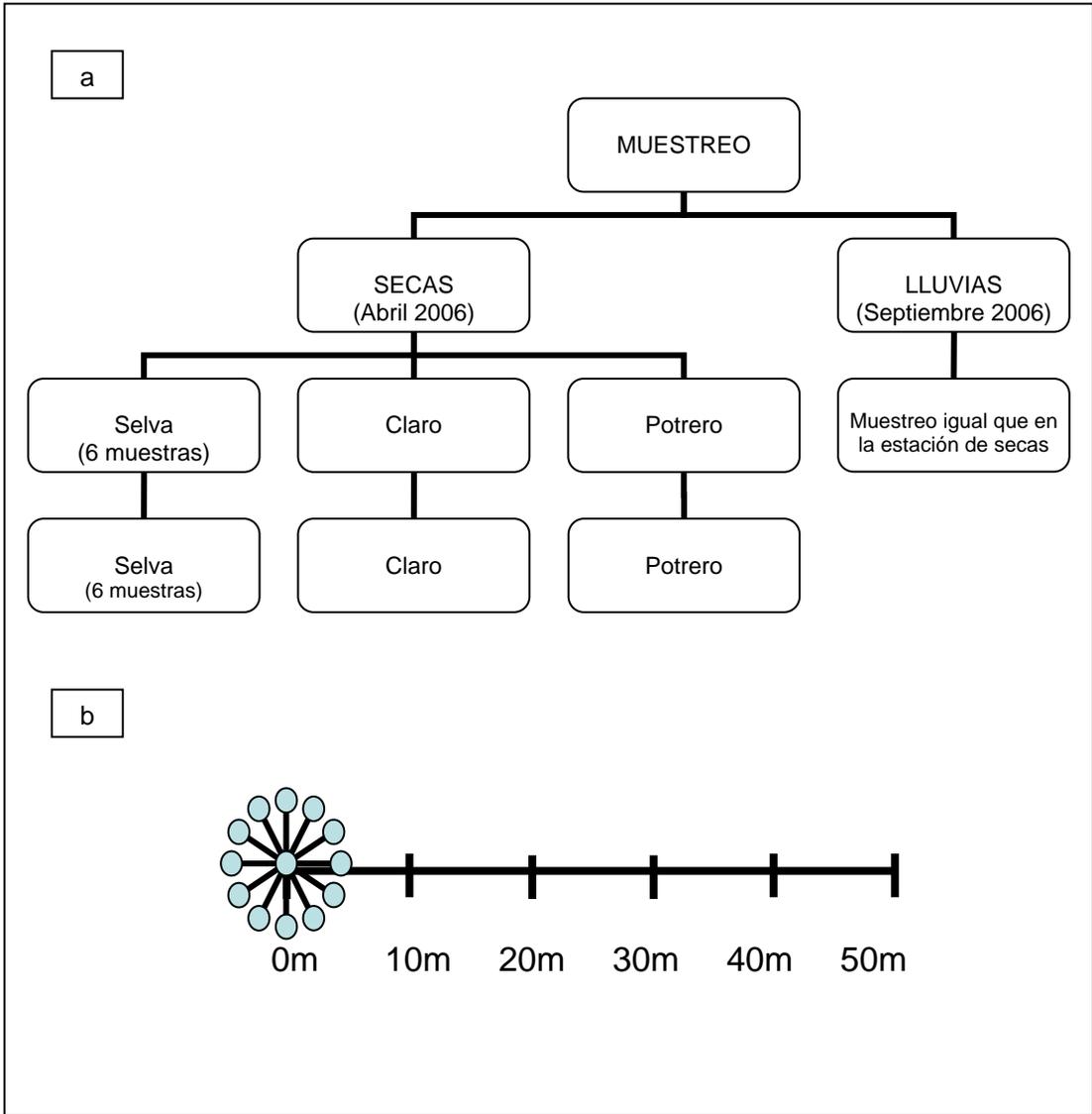


Figura 7. (a) Descripción del muestreo con respecto a las estaciones y ambientes; (b) esquema de cómo se tomaron las muestras compuestas en la línea de 50 m.

5.2.1 Caracterización de los ambientes

Cada ambiente fue caracterizado haciendo un perfil del suelo y tomando muestras de éste para su posterior procesamiento en laboratorio (Figura 8). Las muestras de suelo se enviaron al Laboratorio de Análisis Agua-Suelo-Planta, del Colegio de Posgraduados, para los respectivos análisis físico-químicos.

Además de las muestras de suelo, se hizo una descripción general de los sitios. Para ello, dentro de los fragmentos se colocó una línea de 50m, tomando un metro de ancho para cada lado de la línea. Cada árbol se identificó y clasificó de acuerdo a si habían sido reportadas como especies tolerantes a la sombra (TS) o demandantes de luz (DL) (Martínez-Ramos 1994).



Figura 8. Colecta de las muestras de suelo, así como de las raíces finas del primer horizonte de suelo en el ambiente selva; en la parte superior se distinguen las raíces y la acumulación de hojarasca.

AMBIENTES

1. **Selva.** La cobertura del dosel fue del 100% durante el desarrollo del proyecto. Se observó abundante hojarasca, con un alto porcentaje de árboles juveniles y adultos, abundancia de raíces gruesas y finas formando un tapete grueso difícil de romper. Se identificaron 23 especies vegetales, seis demandantes de luz y 17 tolerantes de sombra. Diez especies registraron la mayor abundancia: *Astrocaryum mexicanum*, *Cecropia obtusifolia*, *Chamaedorea alternans*, *Myriocarpa longipes*, *Omphalea oleifera*, *Piper sanctum*, *Poulsenia armata*, *Pseudolmedia oxyphyllaria*, *Siparuna andina* y *Trophis mexicana* (ver Apéndice 1). Se ubicó en: N 18° 35.426', W 95° 3.485' y N 18° 35.607', W 95° 3.338'. (Figura 9).

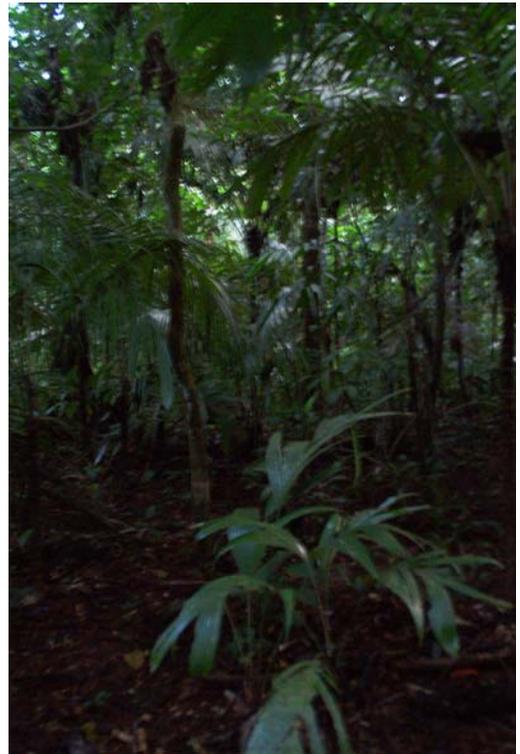


Figura 9. Fotos de un fragmento de selva de la zona de estudio en Los Tuxtlas, Veracruz.

2. **Claro.** En el claro existía una mayor cobertura por plántulas y árboles juveniles (se tomó como referencia el diámetro a la altura del pecho (DAP) y la altura total de los individuos), además de abundantes ramas y troncos de árboles. La abundancia de raíces finas fue alta aunque menor que en la selva; el área promedio del claro era aproximadamente de 20 m x 20 m. En el muestreo se identificaron en total 39 especies de plantas, de las cuales 14 son tolerantes a la sombra y 24 demandantes de luz; cinco especies registraron la mayor abundancia: *Cecropia obtusifolia*, *Hampea nutricia*, *Lycianthes heteroclita*, *Siparuna andina* y *Urera caracasana* (ver Apéndice 1). El claro se ubica en: N 18° 35.066', W 95° 4.607' y N 18° 35.075', W 95° 4.621' (Figura 10 y 10).



Figura 10. Apertura de un claro dentro en la zona de estudio en Los Tuxtlas, Veracruz.

3. **Potrerros.** La vegetación estaba conformada principalmente por pastos y arbustos; se observaron uno o dos individuos adultos de especies arbóreas. Los potreros muestreados fueron “Don Pascual” y “Don Domingo”, localizados a N 18° 35.212', W 95° 3.508' y N 18° 35.241', W 95° 3.598', respectivamente. En el muestreo de la vegetación se reconocieron siete especies de la familia Poaceae, de las cuales sólo una especie fue la más abundante (*Ichnantus nemorosus*) (Figuras 11a y 11b).

a



b



Figura 11. En la zona de potreros se encuentran áreas en donde se puede apreciar la fragmentación (a) y la deforestación (b), además de la cercanía de los fragmentos conservados con éstas zonas.

5.3 Laboratorio

5.3.1 Tinción y cuantificación de la colonización intrarradical.

El método utilizado para la tinción, observación y cuantificación de la colonización intrarradical por los HMA fue el descrito por Phillips y Hayman. (1970) (ver Apéndice 2).

5.3.2 Extracción del micelio externo

La extracción del micelio extrarradical de las muestras de suelo se realizó con la técnica de Miller y Jastrow (1998) (ver Apéndice 3).

La técnica se modificó debido a la abundancia de MO y a la cantidad de arcillas en el suelo. El volumen de la alícuota que se resuspende se aumentó de 6 ml a 12 ml; además, se eliminó la aplicación de calor al momento de la agitación, utilizando una agitadora de plancha.

5.3.3 Cuantificación de colonización extrarradical total

La cuantificación del micelio extrarradical del suelo se realizó con la técnica de Jakobsen (1998) (ver Apéndice 4).

5.3.4 Cuantificación de biomasa radical

La determinación de la biomasa radical se realizó por medio del método descrito en los *Métodos de ecología vegetal* (Steubing *et al.* 2002) (ver Apéndice 5).

5.3.5 Técnicas de determinación de nutrimentos

Los análisis se realizaron de acuerdo a los procedimientos del Laboratorio de Fertilidad de Suelos del Colegio de Postgraduados (ver Apéndice 6).

5.4 Análisis estadístico

Para la colonización intrarradical se usó la prueba de ANdeVA multifactorial (Zar 1999) para analizar las diferencias entre estaciones y microambientes, transformando los datos porcentuales a

arcoseno, lo cual no fue necesario para la colonización extrarradical. Con el fin de detectar las medias estadísticamente diferentes se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (Zar 1999). Por otra parte, se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson y la biomasa de raíces finas y los porcentajes de colonización tanto intrarradical como extrarradical, además de la correlación entre las concentraciones de P, N y C con la colonización intrarradical y extrarradical. Para ello se usó el programa Statistica (ver 6.0).

6 RESULTADOS

6.1 Colonización intrarradical

6.1.1 Colonización total

La colonización intrarradical total registró un mayor porcentaje en el claro ($58.60 \pm 3.52\%$), seguido por la selva ($42.60 \pm 3.63\%$) y, por último, el potrero ($15.20 \pm 2.13\%$) (Figura 12, Cuadro 2). El análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas entre ambientes ($F_{2,66} = 79.89$, $p = 0.001$), y la prueba de Tukey mostró diferencias entre los diferentes ambientes (Figura 12, Cuadro 2).

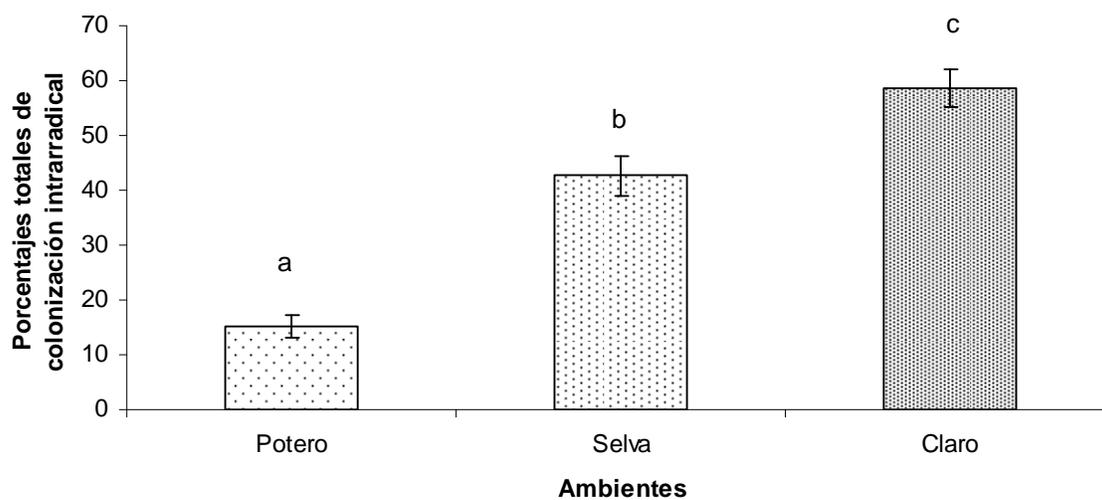


Figura 12. Porcentajes de colonización intrarradical total promedio ($\pm 1EE$) por ambiente. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Cuadro 2. Resultados del ANDeVA para los porcentajes de colonización total promedio, por ambientes y estaciones climáticas.

| Factor de variación | S.C. | g.l. | F | p |
|---------------------|-------|------|--------|-------|
| Estación (1) | 0.913 | 1 | 47.909 | 0.001 |
| Ambiente (2) | 3.047 | 2 | 79.895 | 0.001 |
| 1x2 | 0.038 | 2 | 1.020 | 0.366 |

Con respecto a la estacionalidad, de acuerdo al análisis de varianza la colonización intrarradical total fue significativamente mayor en secas ($48.65 \pm 3.54\%$), que en lluvias ($28.95 \pm 3.66\%$) ($F_{1,66} = 47.90$, $p = 0.001$) (Figura 13, Cuadro 2).

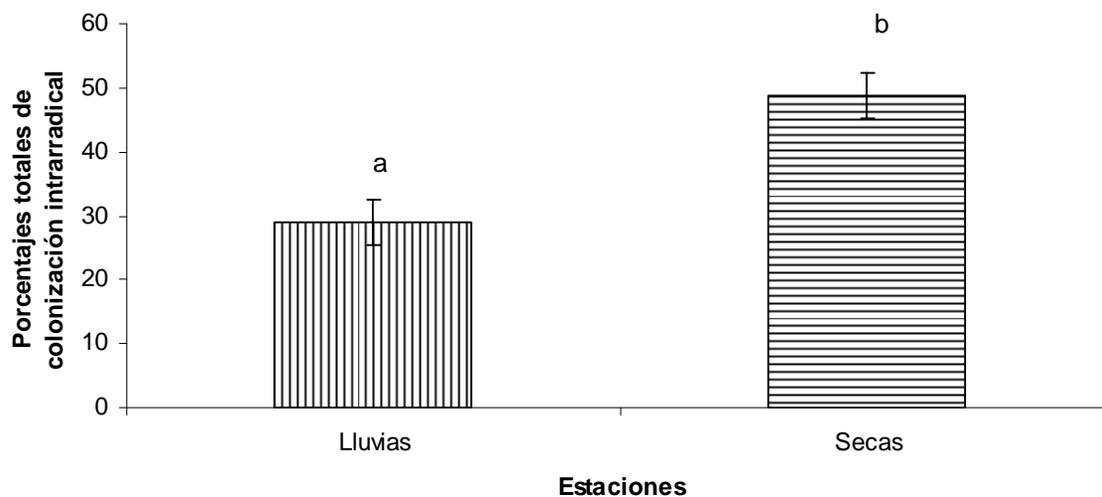


Figura 13. Porcentajes de colonización intrarradical total promedio ($\pm 1EE$) por estación climática. Letras diferentes indican diferencias significativas.

6.1.2 Colonización por estructura

Las hifas fueron la estructura más abundante en los diferentes ambientes, seguida por las vesículas; los arbusculos tuvieron la menor abundancia (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de colonización promedio ($\pm 1EE$) por estructuras de los HMA, para cada ambiente y estación.

| Variable de respuesta | Ambiente | Secas (%) | Lluvias (%) | Promedio de % de colonización |
|-----------------------|----------|------------------|------------------|-------------------------------|
| Hifas | Potrero | 22.29 \pm 2.7 | 7.47 \pm 0.96 | 14.88 \pm 1.83 |
| | Selva | 54.84 \pm 2.52 | 28.46 \pm 3.71 | 41.65 \pm 3.11 |
| | Claro | 66.73 \pm 2.43 | 47.88 \pm 5.47 | 57.07 \pm 3.95 |
| | Total | 47.95 \pm 2.57 | 27.93 \pm 3.38 | 37.94 \pm 2.9 |
| Vesículas | Potrero | 0.23 \pm 0.08 | 0.27 \pm 0.17 | 0.25 \pm 0.12 |
| | Selva | 0.65 \pm 0.35 | 0.46 \pm 0.17 | 0.55 \pm 0.26 |
| | Claro | 0.55 \pm 0.21 | 1.5 \pm 0.31 | 1.02 \pm 0.26 |
| | Total | 0.47 \pm 0.22 | 0.74 \pm 0.22 | 0.6 \pm 0.22 |
| Arbusculos | Potrero | 0.11 \pm 0.06 | 0.04 \pm 0.02 | 0.07 \pm 0.07 |
| | Claro | 0.14 \pm 0.05 | 0.26 \pm 0.11 | 0.2 \pm 0.10 |
| | Selva | 0.41 \pm 0.18 | 0.39 \pm 0.17 | 0.4 \pm 0.26 |
| | Total | 0.22 \pm 0.10 | 0.23 \pm 0.10 | 0.22 \pm 0.1 |

Con respecto a los ambientes, las hifas tuvieron un mayor colonización en el claro, seguido por la selva y, por último, el potrero (57.30%, 41.65% y 14.88%, respectivamente) (Figura 14). La mayor colonización se registró en secas que en lluvias (47.95% y 27.93%, respectivamente) (Figura 15). Se registraron diferencias significativas tanto para ambientes ($F_{2,66} = 84.00$, $p = 0.001$) como para estaciones ($F_{1,66} = 54.30$, $p = 0.001$) (Figuras 14 y 15, Cuadro 4) (ver fotos en las Figuras 16 a 18).

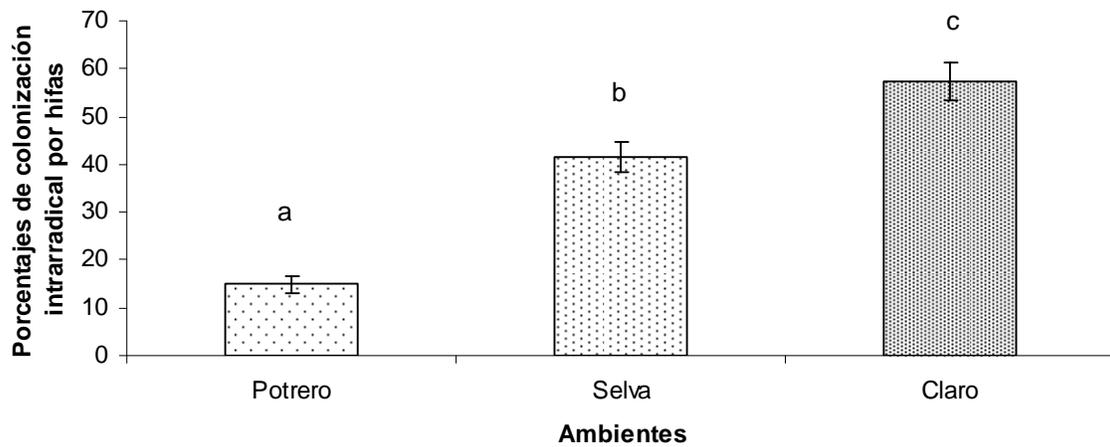


Figura 14. Porcentajes de colonización intraradical promedio para hifas ($\pm 1EE$) por ambiente. Letras diferentes indican diferencias significativas.

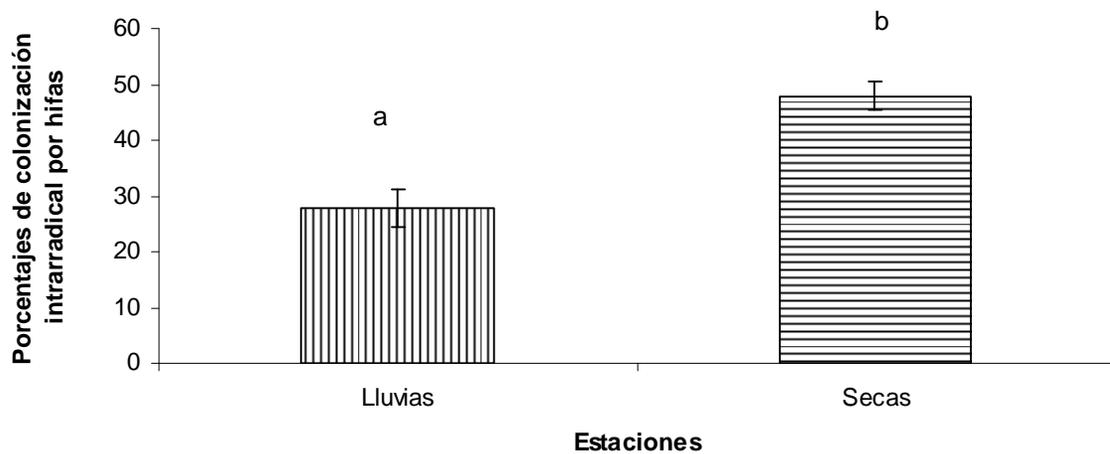


Figura 15. Porcentajes de colonización intraradical promedio para hifas ($\pm 1EE$) por estación climática. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Cuadro 4. Resultados del ANdeVA para los porcentajes de colonización de hifas.

| | Factor de variación | S.C. | g.l. | F | p |
|---------|---------------------|-------|------|--------|-------|
| % Hifas | Estación (1) | 0.945 | 1 | 54.30 | 0.001 |
| | Ambiente (2) | 2.926 | 2 | 84.004 | 0.001 |
| | 1x2 | 0.030 | 2 | 0.879 | 0.420 |

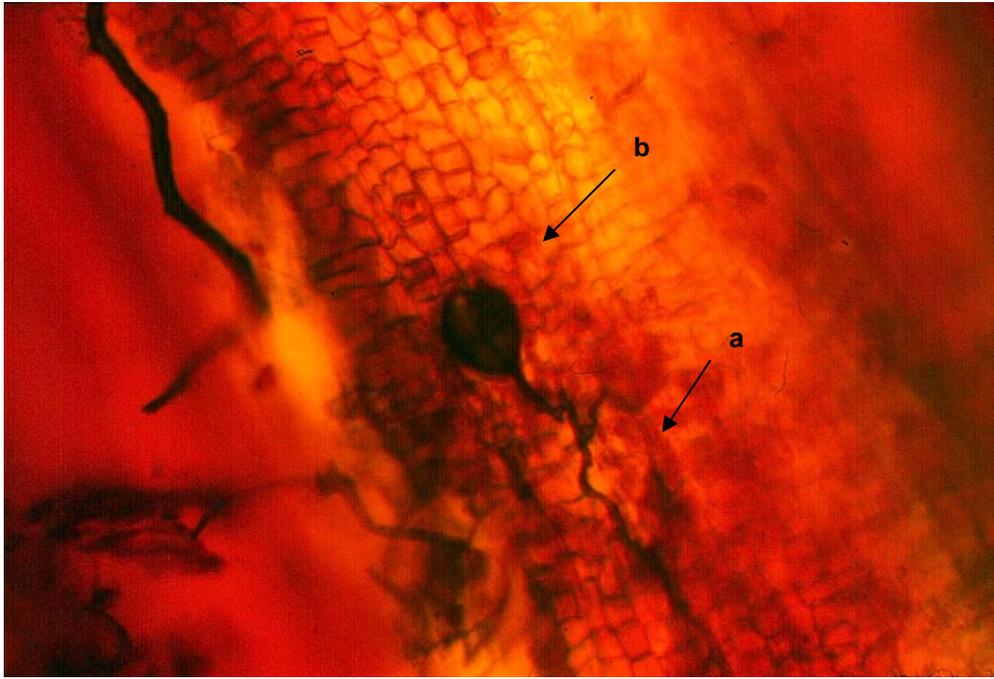


Figura 16. Hifa intrarradical (a) y vesícula de HMA (b) (400x).

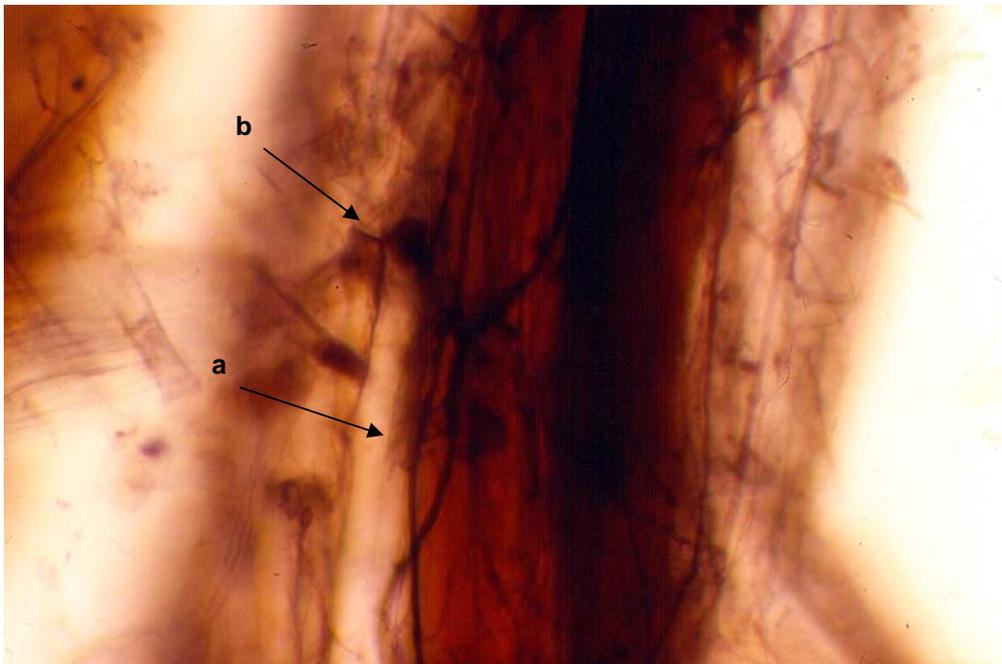


Figura 17. Hifas intrarradicales (a) y vesícula de HMA (b) (400x).

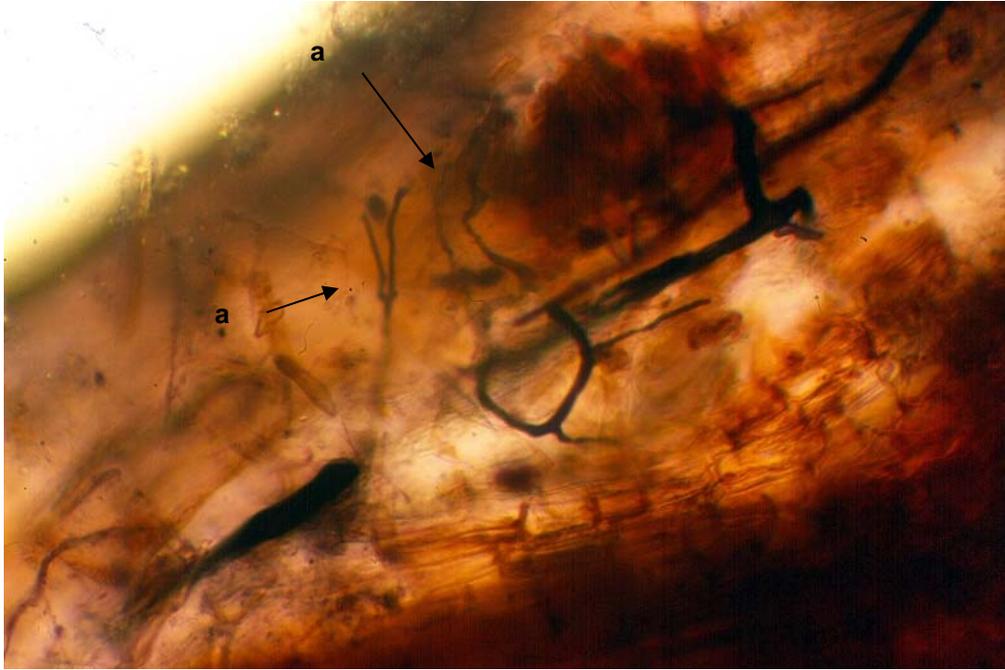


Figura 18. Hifas intrarradicales de HMA (a) (400x).

Para las vesículas, el ambiente con menos colonización fue el potrero (0.25%), seguido de la selva (0.56%) y con mayor abundancia el claro (1.03%) (Figura 19). Al contrario de las hifas, la mayor colonización se registró en lluvias y no en secas (0.75% y 0.48%, respectivamente) (Figura 20, Cuadro 5); de acuerdo al ANdeVA solamente se encontraron diferencias significativas para el ambiente ($F_{2,66} = 5.50$, $p = 0.006$).

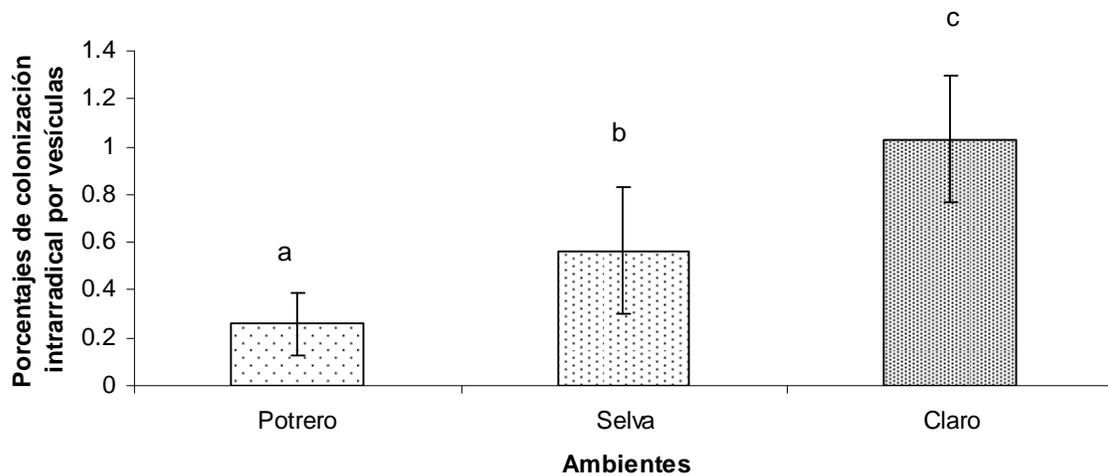


Figura 19. Porcentajes de colonización intraradical promedio de vesículas ($\pm 1EE$) por ambiente. Letras diferentes indican diferencias significativas.

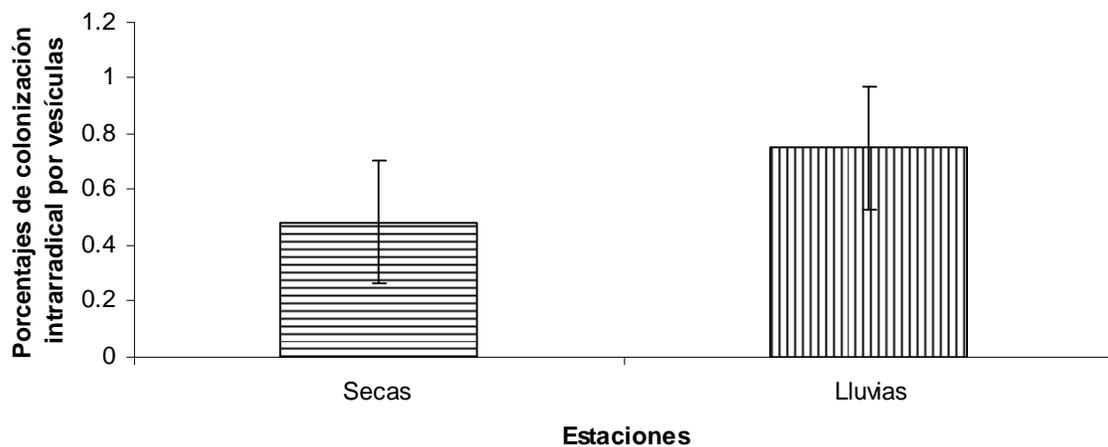


Figura 20. Porcentajes de colonización intraradical promedio de vesículas ($\pm 1EE$) por estación.

Cuadro 5. Resultados del ANDeVA para los porcentajes de colonización por vesículas.

| | Factor de variación | S.C. | g.l. | F | p |
|-------------|---------------------|-------|------|------|-------|
| % Vesículas | Estación (1) | 0.007 | 1 | 2.47 | 0.120 |
| | Ambiente (2) | 0.003 | 2 | 5.50 | 0.006 |
| | 1x2 | 0.016 | 2 | 2.81 | 0.067 |

Los arbúsculos fueron la estructura con menor porcentaje de colonización, obteniéndose los valores más altos en la selva, seguido del claro y, por último, el potrero (0.40%, 0.20%, 0.08%, respectivamente) (Figura 21). En cuanto a las estaciones, al igual que las vesículas, los más altos valores se registraron en lluvias que en secas (0.23%, 0.22%, respectivamente) (Figura 22). Sin embargo, dichas diferencias no fueron significativas en ningún caso (Cuadro 6).

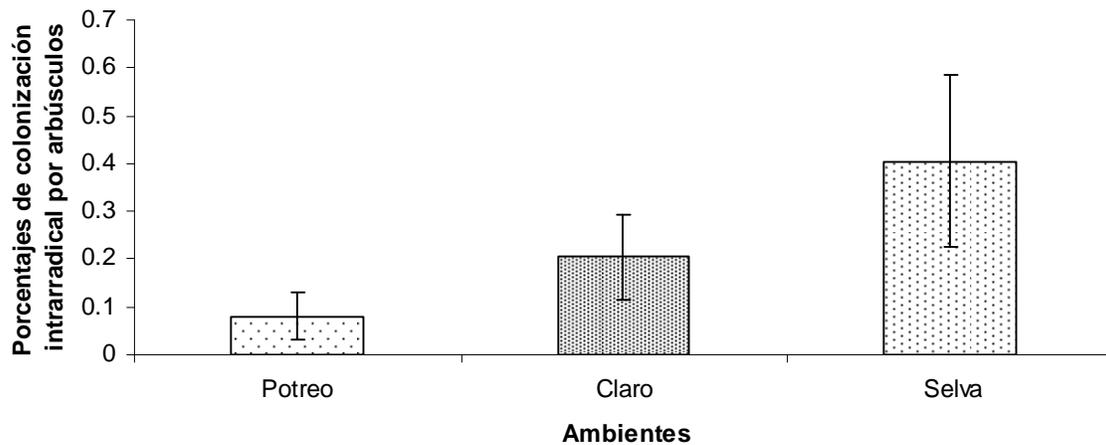


Figura 21. Porcentajes de colonización intrarradical promedio de arbúsculos ($\pm 1EE$) por ambiente.

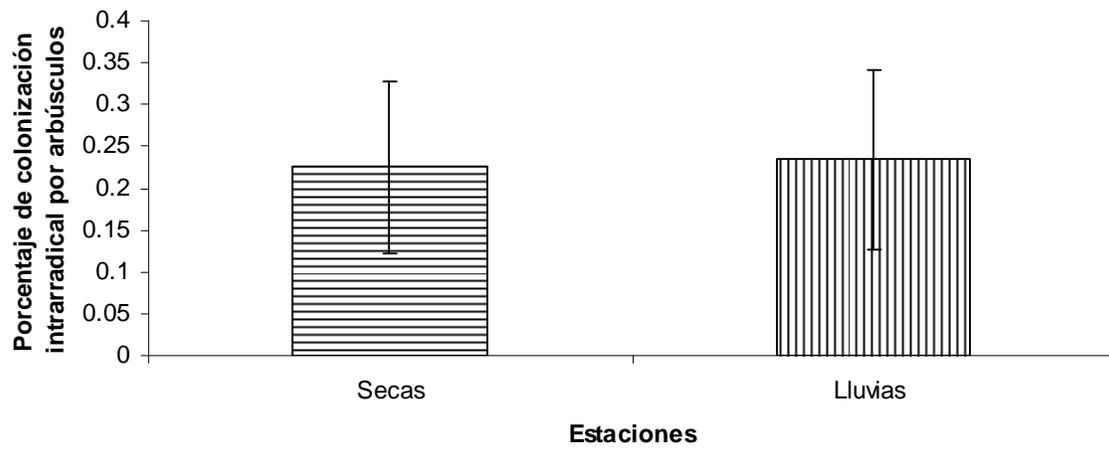


Figura 22. Porcentajes de colonización intrarradical promedio de arbusculos ($\pm 1EE$) por estación.

Cuadro 6. Resultados del ANdeVA para los porcentajes de colonización de arbusculos.

| | Factor de variación | S.C. | g.l. | F | p |
|--------------|---------------------|-------|------|-------|-------|
| % Arbúsculos | Éstación (1) | 0.0 | 1 | 0.1 | 0.821 |
| | Ambiente (2) | 0.008 | 2 | 0.004 | 0.084 |
| | 1x2 | 0.000 | 2 | 0.00 | 0.821 |

6.2 Colonización extrarradical

6.2.1 Colonización total

La colonización extrarradical (o micelio extrarradical, longitud/g de suelo seco) (ver fotos en las Figuras 23 a 25), para cada ambiente, registró valores mayores en el claro ($157.19 \pm 17.57\text{mm/g}$), seguido por la selva ($123.49 \pm 19.51\text{mm/g}$) y por último el potrero ($51.39 \pm 6.02\text{mm/g}$) (Figura 26). El análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas entre ambientes ($F_{2,66} = 15.37$, $p = 0.001$). Por lo que se refiere a la estacionalidad, durante las secas fue mayor la cantidad de micelio extrarradical en comparación de la estación de lluvias (138.65 ± 18.19 y $82.74 \pm 7.32\text{mm/g}$, respectivamente). De acuerdo con el ANDeVA, también existieron diferencias significativas entre estaciones ($F_{1,66} = 12.33$, $p = 0.001$) (Figura 27)(Cuadro 7).

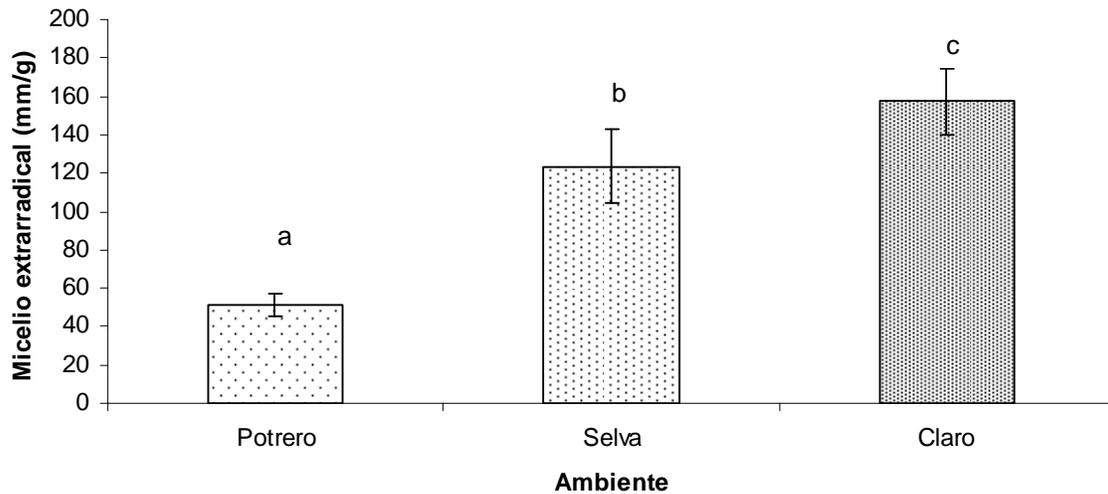


Figura 26. Micelio extrarradical promedio en los tres ambientes estudiados ($\pm 1\text{EE}$). Letras diferentes indican diferencias significativas.

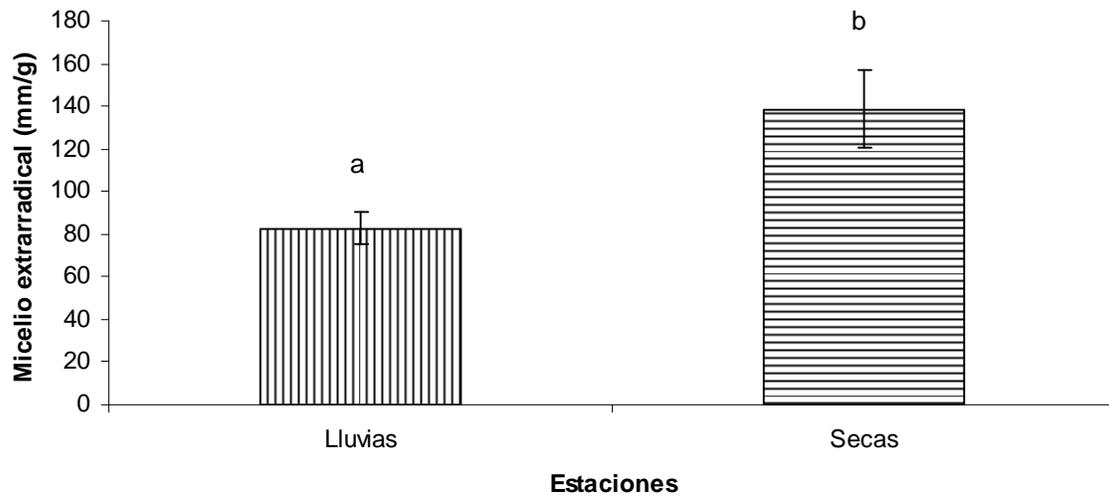


Figura 27. Micelio extrarradical promedio por estación climática ($\pm 1EE$). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Cuadro 7. Resultados del ANDeVA para el micelio extrarradical.

| Fuente de variación | S.C. | g.l. | F | p |
|---------------------|----------|------|---------|-------|
| Estación (1) | 56264.2 | 1 | 12.3395 | 0.001 |
| Ambiente (2) | 140225.0 | 2 | 15.3766 | 0.001 |
| 1x2 | 43517.0 | 2 | 4.7719 | 0.01 |

Éste es el único caso en que la interacción ambiente-estación fue significativa ($F_{1,66} = 4.77$, $p = 0.01$). En la selva se registró mayor cantidad de micelio durante la estación de secas a comparación con la estación de lluvias (169.14 ± 33.0 y 77.84 ± 11.16 mm/g, respectivamente), al igual que en el claro 202.22 ± 27.12 mm/g (secas) y 112.17 ± 13.67 mm/g (lluvias); sin embargo, en el potrero se registró mayor cantidad de micelio en lluvias que en secas (58.20 ± 8.09 y 44.58 ± 8.82 mm/g de micelio extrarradical, respectivamente) (Figura 28).

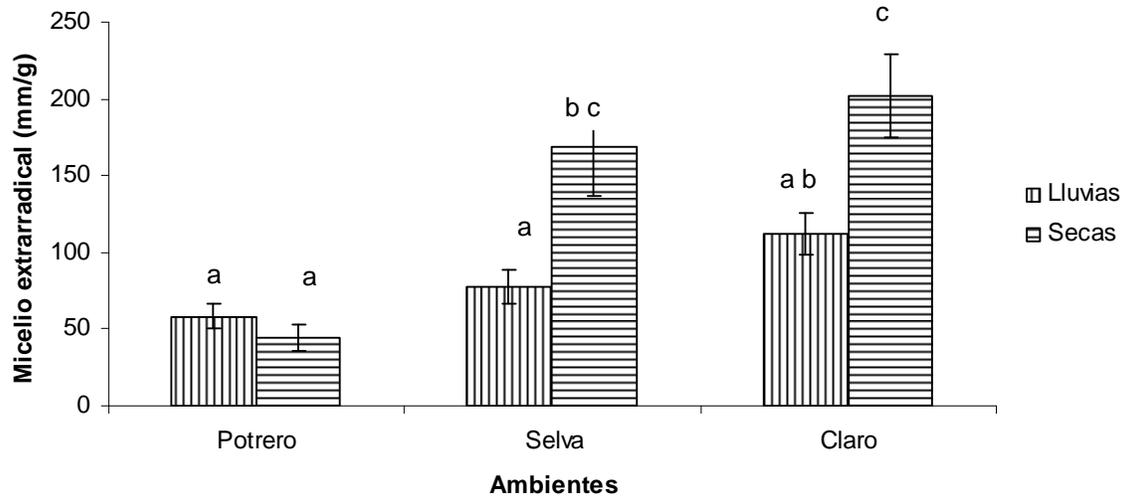


Figura 28. Micelio extrarradical promedio para cada ambiente y estación ($\pm 1EE$). Letras diferentes indican diferencias significativas.

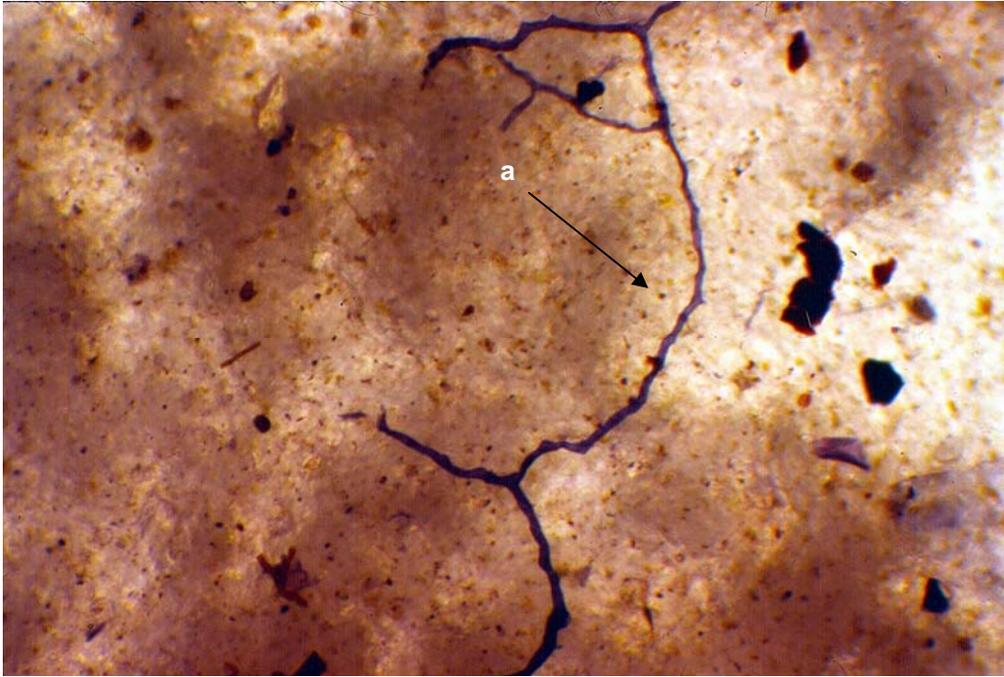


Figura 23. Micelio extrarradical de selva (a) (400x).

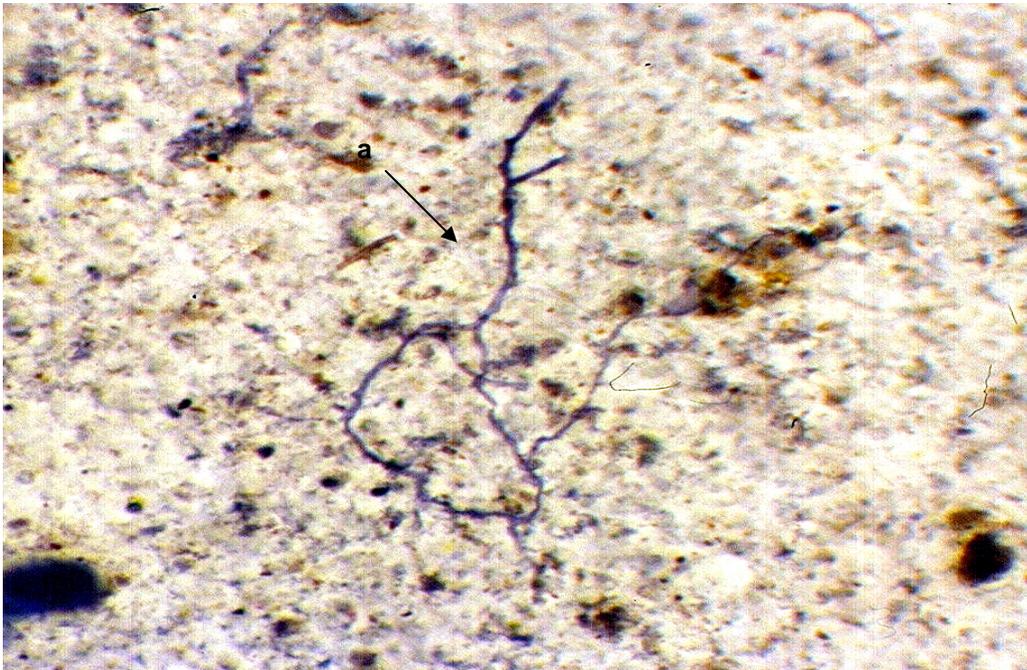


Figura 24. Micelio extrarradical de claro (a) (200x).

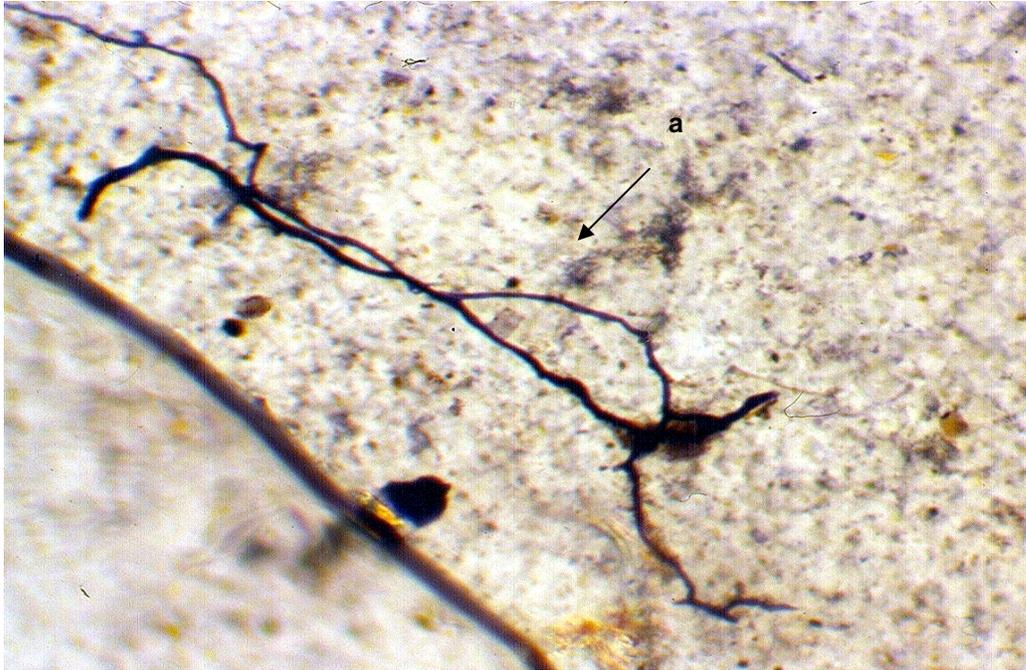


Figura 25. Micelio extrarradical de potrero (a) (400x).

6.3 Coeficientes de correlación

6.3.1 Coeficientes de correlación entre las raíces finas y la colonización intrarradical y extrarradical

Tanto la colonización intrarradical como extrarradical no se correlacionaron con la biomasa de raíces finas por estación (Cuadros 8 y 9).

Cuadro 8. Correlación de las raíces (g) con la colonización intrarradical (CI) y extrarradical (CE) total por estación.

| | CI | CE |
|----------|----------------------------------|-----------------------------------|
| g raíces | $\varphi = -0.125$ $p = 0.29$ | $\varphi = -0.044$ $p = 0.713$ |

Cuadro 9. Correlación de las raíces (g) con la colonización intrarradical (CI) y extrarradical (CE), para cada una de las estaciones del año.

| | | Secas | Lluvias |
|----------|----|---------------------------------|---------------------------------|
| g raíces | CI | $\varphi = -0.15$ $p = 0.35$ | $\varphi = -0.11$ $p = 0.52$ |
| | CE | $\varphi = 0.01$ $p = 0.92$ | $\varphi = -0.21$ $p = 0.19$ |

6.3.2 Coeficientes de correlación entre los tipos de colonización y las concentraciones de nutrimentos en el suelo

Los resultados de los análisis se presentan en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Concentración promedio de nutrimentos en el suelo.

| Ambiente | Estación | N (%) | P (ppm) | C (%) |
|----------|----------|-------------|--------------|--------------|
| Selva | Secas | 0.67 ± 0.12 | 12.85 ± 2.46 | 8.85 ± 3.1 |
| | Lluvias | 0.73 ± 0.09 | 9.35 ± 2.29 | 7.84 ± 1.38 |
| | Promedio | 0.72 ± 0.1 | 11.18 ± 2.3 | 8.61 ± 1.21 |
| Claro | Secas | 0.62 ± 0.06 | 11.90 ± 3.0 | 8.54 ± 1.21 |
| | Lluvias | 0.74 ± 0.11 | 13.05 ± 2.0 | 9.47 ± 1.29 |
| | Promedio | 0.68 ± 0.01 | 12.48 ± 4.0 | 9 ± 1.8 |
| Potrero | Secas | 0.35 ± 0.02 | 9.62 ± 2.7 | 4.98 ± 0.54 |
| | Lluvias | 2.07 ± 0.01 | 34.43 ± 2.11 | 26.29 ± 0.17 |
| | Promedio | 0.38 ± 0.01 | 8.25 ± 2.4 | 5.11 ± 0.35 |

Las concentraciones de P disponible y C orgánico no se correlacionaron con los porcentajes de colonización (Cuadro 14) (Figuras 29 y 30, 31 y 32, respectivamente).

En lo que se refiere a las correlaciones N-colonización intrarradical sí hubo una correlación significativa y positiva para las estaciones de secas y lluvias ($\varphi = 0.59$, $p = 0.02$ y $\varphi = 0.52$, $p = 0.04$, respectivamente) (Figura 33); mientras que la correlación N-colonización extrarradical fue significativa y positiva con la estación de secas ($\varphi = 0.58$ $p = 0.02$) (Figura 34) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Correlación entre la colonización intrarradical (CI) y extrarradical (CE) en secas y lluvias, con la concentración de fósforo disponible (P), nitrógeno total (N) y carbono orgánico (C).

| Nutrimiento | Colonización | Secas | Lluvias |
|-------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|
| P (ppm) | CI | $\varphi = 0.22$ | $\varphi = 0.03$ |
| | | $p = 0.45$ | $p = 0.91$ |
| | CE | $\varphi = 0.20$ | $\varphi = -0.13$ |
| | | $p = 0.48$ | $p = 0.62$ |
| N (%) | CI | $\varphi = 0.59$ | $\varphi = 0.52$ |
| | | $p = 0.02$ | $p = 0.04$ |
| | CE | $\varphi = 0.58$ | $\varphi = 0.02$ |
| | | $p = 0.02$ | $p = 0.92$ |
| C (%) | CI | $\varphi = 0.43$ | $\varphi = 0.31$ |
| | | $p = 0.11$ | $p = 0.25$ |
| | CE | $\varphi = 0.03$ | $\varphi = -0.30$ |
| | | $p = 0.91$ | $p = 0.26$ |

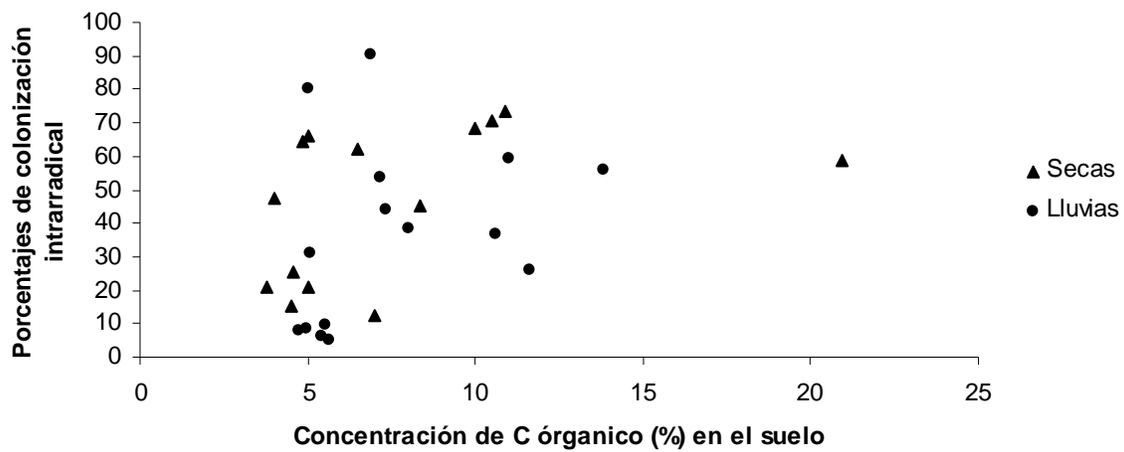


Figura 29. Porcentaje de colonización intrarradical en función de la concentración de C orgánico (%) para las estaciones de secas y lluvias. No se determinó una correlación lineal.

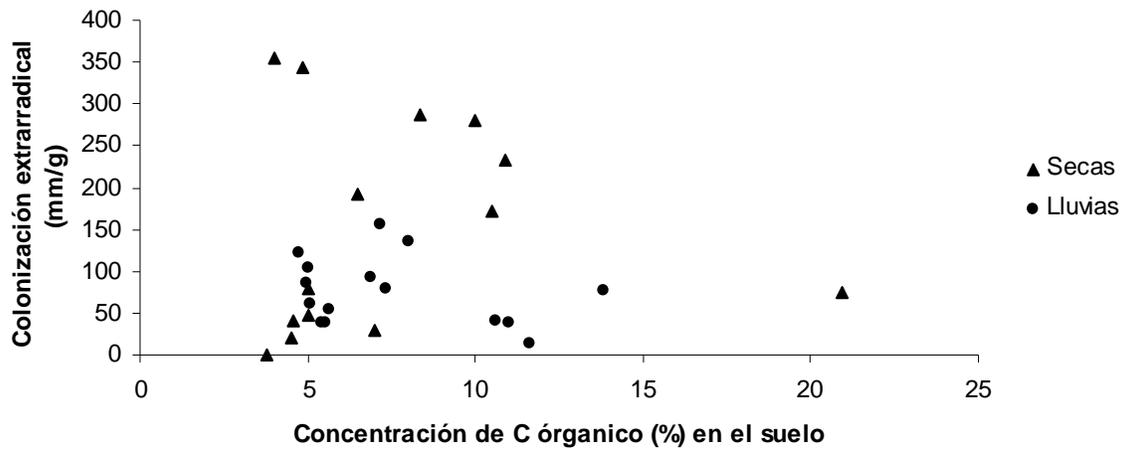


Figura 30. Micelio extrarradical en función de la concentración de C orgánico (%) para las estaciones de secas y lluvias. No se determinó una correlación lineal.

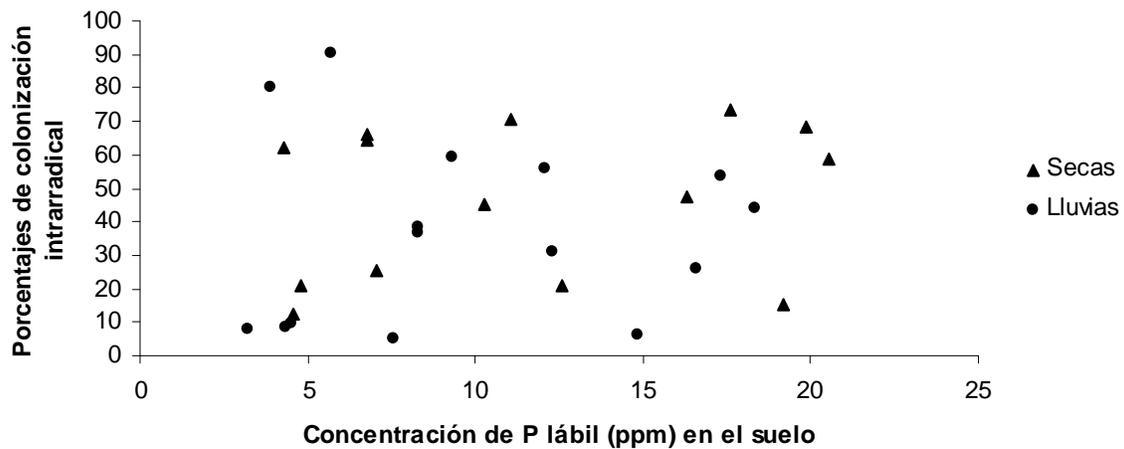


Figura 31. Porcentaje de colonización intrarradical en función de la concentración de P (ppm) para las estaciones de secas y lluvias. No se determinó una correlación lineal.

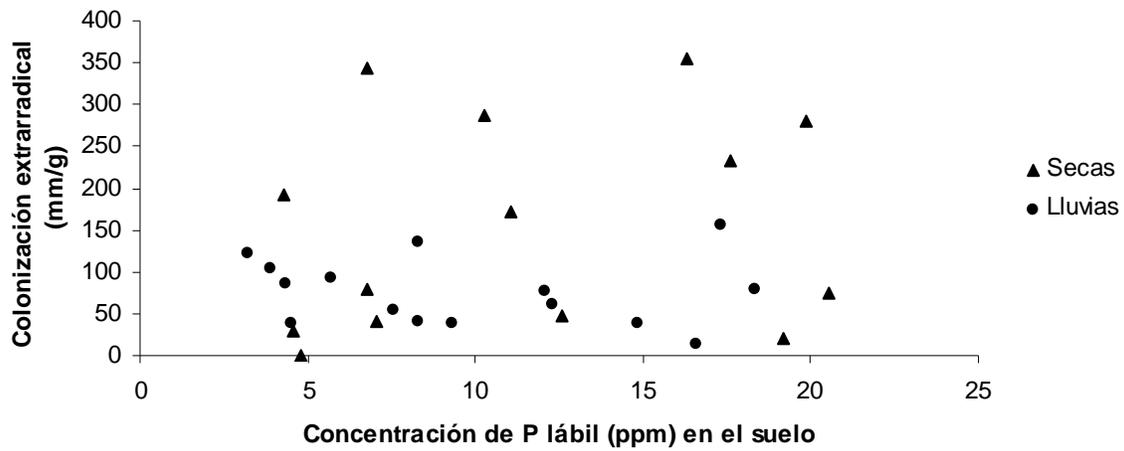


Figura 32. Micelio extrarradical en función de la concentración de P (ppm) para las estaciones de secas y lluvias. No se determinó una correlación lineal.

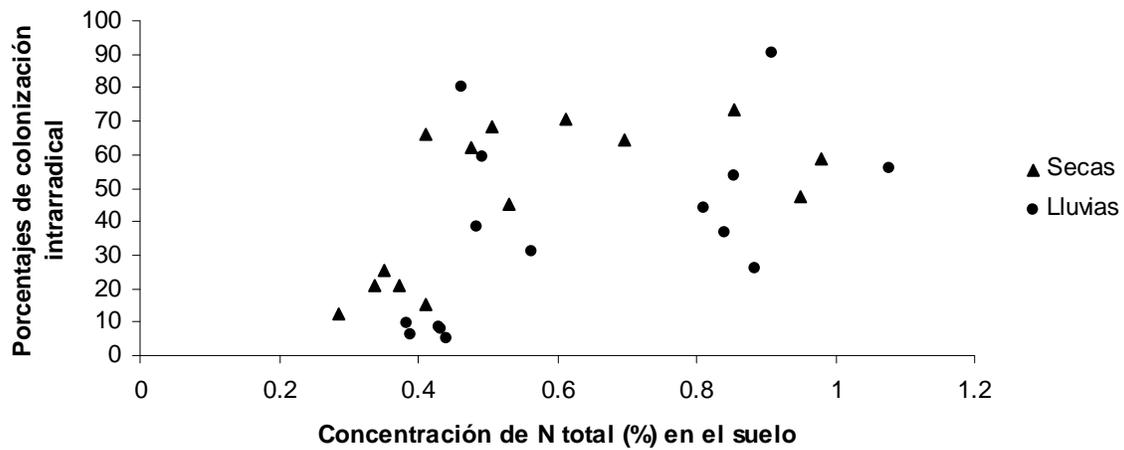


Figura 33. Porcentaje de colonización intrarradical en función de la concentración de N, para las estaciones de secas ($\varphi = 0.59$, $p = 0.02$) y lluvias ($\varphi = 0.52$, $p = 0.04$); existe una correlación lineal significativa.

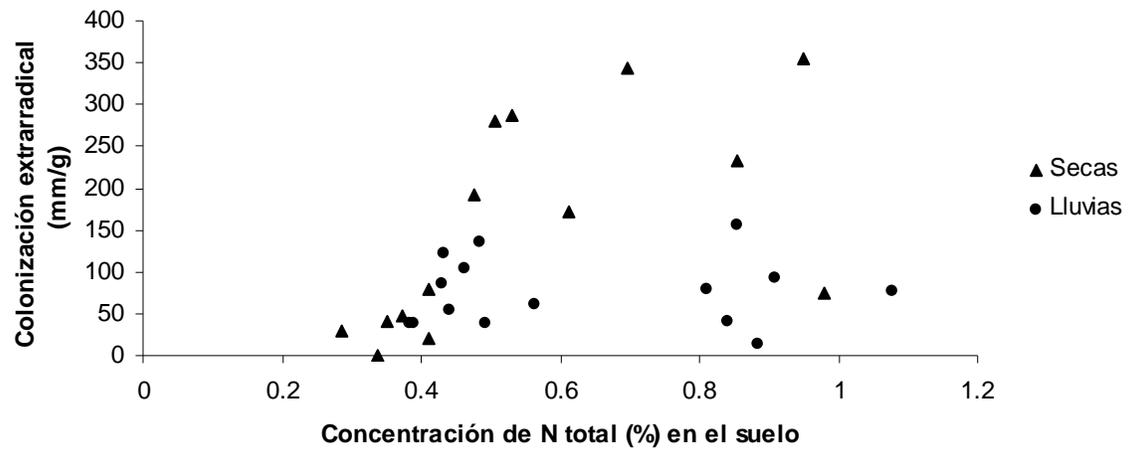


Figura 34. Micelio extrarradical en función de la concentración de N para las estaciones de secas ($\varphi = 0.58$, $p = 0.2$) y lluvias, encontrando una correlación lineal significativa.

7 Discusión

En la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas debido a la alta diversidad de especies vegetales, tanto la fisiología, las concentraciones de nutrimentos (baja en el caso del P, Sommer-Cervantes *et al.* 2003), así como la eventual complementariedad funcional de las plantas con los HMA, sugieren que se puede favorecer la colonización (Allen 2001).

En la selva, las aperturas del dosel son parches que se modifican en el espacio y el tiempo, resultando en un mosaico dinámico de ambientes de luz en la selva; cuando algunas plantas están saturadas de sol, otras están limitadas de este recurso. En el caso de los porcentajes totales de colonización intrarradical y extrarradical, el ambiente claro tuvo la mayor colonización en la estación de secas ($58.60\% \pm 3.52$ y 157.19 ± 17.57 mm/g, respectivamente). Los cambios en los porcentajes de colonización probablemente se deban a que el desarrollo y el establecimiento de los HMA esta relacionado con la disponibilidad de luz, así como también con la cantidad de carbohidratos que puede producir la planta (Whitbeck 2001). El aumento en la disponibilidad de luz que se presenta en los claros promueve el crecimiento de las plantas dentro y alrededor de éste, lo que se ve reflejado en el incremento de intercambio de nutrimentos de la planta hacia los HMA y viceversa, factores que estimulan la colonización. Por otro lado, Núñez-Castillo y Álvarez-Sánchez (2003) demostraron también que, en los claros, hay una mayor colonización por vesículas en *Astrocaryum mexicanum*.

Las especies demandantes de luz (DL) empiezan su ciclo de vida en los claros, siendo éstas más eficientes reproductivamente así como en su establecimiento. Algunos autores (Siqueira *et al.* 1998, Zangaro *et al.* 2000) han mostrado que estas especies poseen altas tasas de colonización y susceptibilidad a la colonización con HMA, además de ser más dependientes de los HMA para su crecimiento y reproducción (Kiers *et al.* 2000), en contraste a las especies tolerantes a la sombra. En el caso de la selva de "Los Tuxtlas", Guadarrama *et al.* (2004) demostraron que *Heliocarpus appendiculatus*, una planta DL, muestra dependencia micorrícica además de concluir, que los HMA pueden afectar también la habilidad competitiva de plantas individuales en una comunidad (Guadarrama *et al.* 2004).

En nuestro estudio, la mayor cantidad de especies demandantes de luz se encontraron en el claro. De acuerdo con Janos (1980), algunas de las especies muestreadas son consideradas como micótrofas facultativas, como es el caso de *Carica papaya*, *Solanum* sp. y algunas otras son micotróficas como *Hampea nutricia*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Pouteria sapota*. Si las especies DL son las primeras en emerger y la mayoría de las especies son micótrofas, ello permitiría justificar que debido a sus requerimientos, presentan el mayor porcentaje de colonización dentro de los claros. Sin embargo, esta afirmación y nuestros resultados contradicen lo que Janos

(1980) dice, que a medida que se avanza en la sucesión vegetal, la dependencia micorrícica también aumenta.

Con respecto a la colonización por estructura, las hifas presentaron los mayores porcentajes totales de colonización con respecto a las otras estructuras, y los valores promedio fueron mayores durante la estación de secas que de lluvias ($66.73\% \pm 2.43$ y $47.88\% \pm 5.47$, respectivamente). Las hifas se desarrollan rápidamente y sirven tanto de soporte al hongo micorrizógeno como para transportar nutrientes (Bago *et al.* 2000); ya que son las estructuras más abundantes, pueden actuar como propágulos fuera de la raíz, además de que dentro de una raíz inoculada pueden inocular a otras. Es la primera estructura en emerger, por lo que es común que se encuentren en abundancia dentro de ambientes propicios a ser colonizados, como es el caso de los claros.

Las vesículas son las estructuras que siguieron en términos de su porcentaje luego de las hifas, observándose en la estación de lluvias que de secas y en los claros los porcentajes más altos ($1.55\% \pm 0.31$ y $0.55\% \pm 0.21$, respectivamente). Al existir mayor disponibilidad de recursos, éstos pueden almacenarse en las vesículas. Según Núñez-Castillo y Álvarez-Sánchez (2003) las vesículas indican altos niveles de colonización en claros con respecto a la selva, aspecto que fue muy evidente en las raíces de la palma *Astrocaryum mexicanum*, probablemente porque en dicho ambiente tienen ventajas por la mayor cantidad de fuente de nutrientes que en los sitios de selva con dosel cerrado, ya que estos son sitios de acumulación de materia orgánica particularmente de árboles que se han caído y se están desintegrando en dicho sitios. Nuestro estudio también concuerda con lo descrito por Whitbeck (2001), quien encontró mayor colonización por vesículas en los claros que en los sitios con el dosel cerrado en una selva de Costa Rica; dicho autor explica que esto es debido a que la intensidad de luz regula el crecimiento y desarrollo tanto de las plantas, como de la colonización por HMA, dando como resultado un desarrollo mayor de los hongos micorrizógenos en sitios con apertura de dosel, que en sitios con baja disponibilidad de recursos, estimulando la síntesis de C por una mayor actividad fotosintética.

Gehring *et al.* (2003) trabajaron con cuatro especies de árboles tolerantes a la sombra de una selva alta perennifolia en Australia, observando una mayor colonización en los sitios con apertura de dosel. Estos autores consideran que los bajos niveles de luz del dosel cerrado pueden causar una baja colonización de las especies. Muchos mecanismos se han propuesto para explicar la reducción de la colonización intraradical con poca radiación; por ejemplo, la cantidad de luz está asociada con los exudados de las raíces, así como también con bajas concentraciones de carbohidratos en éstas (Gehring *et al.* 2003). Mucho de la inversión del carbono en la asociación micorrícica, pudo haberse originado en los árboles del dosel cerrado como resultado de un bajo costo del C de las plántulas en ambientes con poca luz.

Los arbúsculos son las estructuras donde se lleva a cabo el intercambio bidireccional de los nutrimentos y pueden ser considerados como las estructuras que reflejan que la colonización de los HMA llega a su completo establecimiento y desarrollo (Bago *et al.* 1998). En los claros, sin embargo, al ser un ambiente en formación, los porcentajes de arbúsculos no fueron los mayores registrados, aunque la estación en la que más abundaron fue en lluvias ($0.23\% \pm 0.10$ y $0.22\% \pm 0.10$, respectivamente), debido a que el hongo este invirtiendo en almacenar nutrimentos para su posterior desarrollo. Durante la estación de lluvias se observan las mayores tasas de descomposición en la selva (Álvarez-Sánchez y Becerra 1996) por lo que se desencadena una gran actividad de la biota edáfica (Barajas-Guzmán y Álvarez-Sánchez 2003), lo que resulta en una mayor mineralización de nutrimentos disponibles para ser intercambiados a través de los arbúsculos.

En cuanto a la colonización extrarradical, en el claro se obtuvieron valores (157.19 ± 6.02 mm/g) similares a los reportados por Powers *et al.* (2005) en un estudio que realizaron en selvas de Costa Rica, Brasil, Perú y Panamá ($149-156$ mmg⁻¹); esto confirma el hecho de que sitios de reciente apertura ofrecen recursos que pueden ser encontrados por la actividad del micelio extrarradical y se confirma por la mayor colonización intrarradical por hifas.

Por lo que se refiere al micelio externo, la colonización fue significativamente diferente entre las estaciones. Jasper *et al.* (1989), demostraron que la red micelial de *Acaulospora laevis* puede mantener su infectividad en el suelo seco hasta por 36 días; mostraron que la red hifal sobrevive aún en condiciones de poca agua en el suelo. El aumento de la colonización micorrízica en la estación de secas en la selva de Los Tuxtlas, puede deberse a que el HMA invierte energía en la colonización intrarradical, es decir, en consolidar la relación con la planta (Guadarrama y Álvarez-Sánchez 1999) pero, al mismo tiempo, para que esta simbiosis ocurra, se requiere de nutrimentos y agua, por lo que la colonización extrarradical también aumenta.

La selva fue el segundo ambiente con niveles de colonización extrarradical altos (123.46 ± 19.51 mm/g). La selva bajo el dosel cerrado tiene más restricción de recursos que son demandados por las especies, y es un ambiente en el cual se observa, además, una capa de raíces que se entremezclan (Sánchez-Gallen y Álvarez-Sánchez 1996). Sin embargo, se ha mencionado que la transferencia de carbono de las plantas por medio de la red hifal en ambientes de umbría puede promover el crecimiento de las plántulas en sitios sin disturbios y con poca luz dentro de la selva; ello implicaría un mejor desarrollo de hifa extrarradical que no fue observado.

Las prácticas de manejo como consecuencia del cambio de uso del suelo constituyen un disturbio que altera la abundancia y la composición de los HMA (Oehl *et.al* 2003). Por esta razón en los potreros se obtuvieron los menores porcentajes de colonización intrarradical y extrarradical

($15.20\% \pm 2.13$ y 51.39 ± 6.02 mm/g, respectivamente), debido a que las condiciones ambientales cambian significativamente en comparación con los dos ambientes anteriores (selva y claro), así como también ocurre un reemplazamiento de la vegetación nativa por pastos cultivados y la invasión de los terrenos por ganado.

Es posible que cuando ocurre una perturbación en el suelo se reduzca la incidencia de contacto entre la planta y los HMA, ya que la mayoría de los propágulos de estos hongos están localizados en la superficie del suelo, entre los 0-15 cm; una reducción en la formación de micorriza podría limitar el crecimiento subsecuente del micelio extrarradical, y por consiguiente, la colonización intrarradical (Boddington *et al.* 2000). Al igual que en el caso de McGonigle *et al.* (2000), nuestros resultados también concuerdan con lo descrito con Jasper *et al.* (1989) y por Boddington *et al.* (2000), en los que la perturbación del suelo tiene dos efectos en la colonización extrarradical: en primer lugar, separa la mayor parte de la hifa extrarradical de la raíz y, en segundo lugar, se rompe la red hifal. La interrupción de la red hifal por la perturbación del suelo reduce la red a pequeños segmentos que son menos efectivos en la colonización y transporte de nutrimentos.

Por otro lado, las especies de HMA pueden responder de formas diferentes a la perturbación del suelo, dependiendo tanto de la complementariedad funcional con la planta, como de la distribución que los HMA muestren en la colonización (McGonigle *et al.* 2000). Sin embargo, Sánchez-Gallen *et al.* (datos no publicados) encontraron, en zonas de pastizales ganaderos al sur de la región de Los Tuxtlas, una mayor colonización lo cual explican estuvo correlacionado con la mayor diversidad de HMA, más que a la mayor diversidad de plantas.

La respuesta de los HMA en relación al N puede ser variable, ya que puede estimular o suprimir la colonización en las raíces (Beat *et al.* 1993). En nuestro estudio, sólo se encontró una correlación significativa entre la colonización intrarradical y extrarradical con la concentración de N en el suelo, lo que confirma el efecto que se ha planteado tienen los HMA en la absorción de N (Allen 1991). Lo anterior sugiere que una baja densidad de raíces, con el micelio que las coloniza y el que explora, haría el proceso de captura del N en un área más eficiente. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo difieren con la teoría sobre la simbiosis micorrícica, que explica que los HMA colonizan en mayor porcentaje a mayor carbono adquirido e intercambiado por P, cuando este nutrimento es el recurso limitante (Johnson 2009).

En un trabajo realizado por Treseder *et al.* (2002), estudiaron tres sitios con edades diferentes en una selva alta perennifolia en Hawaii; el sitio joven fue mencionado como sitio limitado por el N (3.31 ± 1.56 μg por bolsa día^{-1}), el intermedio como fértil (12.37 ± 3.32 μg por bolsa día^{-1}), mientras que el sitio de más edad estuvo limitado por el P (14.41 ± 7.20 μg por bolsa

d⁻¹). En dicho estudio, usaron *Metrosideros polymorpha* como planta trampa ya que esta especie es nativa de Hawaii además de ser una especie micorrícica. Treseder *et al.* (2002) mencionan que en sitios limitados por N al adicionar nutrimentos tuvieron un incremento en la biomasa total como resultado de la colonización, además de que la producción de biomasa de hifas fue mayor en sitios fértiles con una adición de nutrimentos.

En la selva de Los Tuxtlas, se ha reportado que las reservas de N total son adecuadas (Sommer-Cervantes *et al.* 2003), y los almacenes de N en el suelo mineral en una cronosecuencia sucesional fueron relativamente estables (Hughes *et al.* 1999). Sin embargo, en términos de la disponibilidad para las plantas, el N podría ser un nutrimento limitante, modificando la respuesta de colonización de los HMA. En sitios limitados de N tanto la concentración del mismo como los intervalos de C proveniente de las plantas, pueden inhibir el crecimiento de los HMA. Los hongos en sitios con limitación de N reciben un mayor intercambio de carbohidratos por parte de las plantas que de los HMA en sitios fértiles, sin embargo, es probable que esta respuesta no esté acompañada de un incremento del micelio extrarradical o de la colonización intrarradical.

8 Conclusiones

En este trabajo se realizaron muestreos de un conjunto de raíces y suelo rizosférico, para determinar los porcentajes de colonización en diferentes ambientes en dos estaciones de muestreo en una selva alta perennifolia.

Con respecto a los ambientes, la mayor colonización intrarradical y extrarradical ocurrió en el claro, seguido de la selva y por último el potrero; esto debido a que la apertura de un claro aumenta la disponibilidad de recursos como agua, luz y nutrimentos, así como también afecta la fenología de las plantas hospederas. Estos son factores que influyen directamente en los porcentajes de colonización de los HMA; asimismo, el cambio de uso de suelo es otro factor que altera la composición y abundancia de los hongos micorrizógenos, como ocurre en el caso de los potreros con la menor producción de micelio.

Se confirmó nuestra hipótesis de que la colonización intrarradical sería mayor en secas que en lluvias; ello manifiesta que el hongo genera estructuras de resistencia como lo son las esporas y un aumento en su desarrollo en la endodermis de las raíces, lo que estimula la colonización intrarradical. Sin embargo, contrariamente a lo esperado la colonización extrarradical también fue más alta en la estación seca del año. Lo anterior es resultado de la consolidación de la asociación del hongo micorrizógeno con la planta hospedera, ya que el hongo no gasta recursos para colonizar otras plantas. Sin embargo, es necesario la exploración del suelo para la búsqueda y absorción de recursos para el intercambiarlos por C, y así mantener con ello la relación mutualista.

Se determinó que existe una correlación positiva entre la cantidad de N en el suelo y la colonización intrarradical y extrarradical, lo que sugiere que el nitrógeno actúa como nutrimento limitante en la simbiosis micorrizica. Ello muestra que el N es un elemento importante para las plantas en el sitio de estudio como factor que influencia la colonización de los HMA.

LITERATURA CITADA

Addy, H. D., Miller, R. L. y Peterson, R. L. (1997). Infectivity of the propagules associated with extraradical mycelia of two AM fungi following winter freezing. *New Phytologist*. 135(4):745-753.

Al-Karaki, G., McMichael, B. y Zak, J. (2004). Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*. 14:263-269.

Allen, M. 1991. *The Ecology of Mycorrhizae*. Cambridge University Press. 184 pp.

Allen, M. F. (2001). Modeling arbuscular mycorrhizal infection: is % infection an appropriate variable?. *Mycorrhiza*. 10(5)255-258.

Álvarez-Sánchez, J. y Becerra, R. (1996). Leaf decomposition in a mexican tropical rain forest. *Biotropica*. 28(4b):657-667.

Augé, R. M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11:3-42.

Bago, B. C., Azcón-Aguilar C., Goulet, A. y Piche, Y. (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 139:375-388.

Bago, B., Azcón-Aguilar C., Schachar-Hill, Y. y Pfeffer, P.E. (2000). El micelio externo de las micorrizas arbusculares como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. En: Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. (Eds). *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular México*: Mundi Prensa. pp. 78-92.

Barajas-Guzmán, G. y Álvarez-Sánchez, J. (2003). The relationships between litter fauna and rates of litter decomposition in a tropical rain forest. *Applied Soil Ecology*. 24:91-100.

Beat F. y Hannes S. (1993) Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays*. *New Phytologist*. 124:221-230.

Bendavid-Val, R., Rabinowitch, H. D., Katan, J. y Kapulnik. Y. (1997). Viability of VA-mycorrhizal fungi following soil solarization and fumigation. *Plant and Soil*.195:185-193.

- Boddington, C. L. y Dodd, J. C. (2000). The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. I. Field studies in an Indonesian ultisol. *Plant and Soil*. 218:137-144.
- Bohrer, K. E., Friese, C. F. y Amon, J. P. (2004). Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. *Mycorrhiza*. 14:329-337.
- Bremner, J. M. (1965). Total nitrogen, p. 1179-1237. In C. A. Black (ed.), *Methods of soil analysis*, vol. 2. American Society of Agronomy, Madison, Wis.
- Brown, A.M. y Bledsoe, C. (1996) Spatial and temporal dynamics of mycorrhizas in *Jaumea carnosa*, a tidal saltmarsh halophyte. *Journal of Ecology*. 84:703–715.
- Brundrett, M. (1991). Mycorrhizae in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research*. 21:171–213.
- Brundrett, M. y Abbott, L. K. (1994). Mycorrhizal fungus propagules in the Jarrah forest. I seasonal study of inoculum levels. *New Phytologist*. 127:539-546.
- Brundrett, M., Bougher, N. L., Dell, B., Grove, T. y Malajczuk, N. (1996) *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR). Canberra, AU. 374pp.
- Carvalho, L. M., Cacador, I. y Martins-Loucao, M. A.. (2001). Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizae in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza*. 11:303–309.
- Campos, C. A. (2004). El Suelo. En: Guevara, S., Laborde, J. y Sánchez-Ríos, G. (Eds.). *Los Tuxtlas. El paisaje de la sierra*. Instituto de Ecología, A.C. y Unión Europea. Xalapa, Ver. pp. 181-192.
- Castillo-Campos, G. y Laborde, J. (2004). La vegetación. En: Guevara, S., Laborde, J. y Sánchez-Ríos, G. (Eds.). *Los Tuxtlas. El paisaje de la sierra*. Instituto de Ecología, A.C. y Unión Europea. Xalapa, Ver. pp. 231-265.
- Cooper, K. M. (1984). Physiology of VA mycorrhizal associations. En: C. L. Powell y D. J. Bagyaraj (Eds.). *VA Mycorrhiza*. CRC Press, Florida. pp. 155–186.

Davies, F. T. Jr., Potter, J. R. y Linderman, R. G. (1992). Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *Journal of Plant Physiologist*. 139:289-294.

Dirzo, R. y García, M. C. (1992). Rates of deforestation in Los Tuxtlas, a Neotropical area in southeast Mexico. *Conservation Biology*. 6 (1): 84-90.

Duods, D. Jr. y Schenck, N. C. (1990). Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. *New Phytologist*. 116:621-627.

de Grandcourt, A., Epron, D., Montpied, P., Louisanna E., Barea M., Garbaye, J. y Guehl, J. (2004). Contrasting responses to mycorrhizal inoculation and phosphorus availability in seedling of two tropical rainforest tree species. *New Phytologist*. 161:865-875.

EDIS. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Importance of Mycorrhizae for Agricultural Crops.[En línea] disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/AG116> (Revisado el 26 de mayo de 2009).

Etchevers, B. J. D., (1988). *Notas de clase de Analisis Quimico de suelos y Plantas*. Colegio de Postgraduados.

Etchevers, B.J. D., (1992). *Manual de Métodos para Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes. Análisis Rutinarios en Estudios y Programas de Fertilidad. Laboratorio de Fertilidad de Suelos*, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 80 pp.

Etchevers, B.J. D., Monreal C., Acosta M., Hidalgo C., Padilla J. y López R.M. (2005). *Manual para la Determinación de Carbono en la Parte Aérea y Subterránea de Sistemas de Producción en Laderas. Proyecto sustentable de laderas*, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. Documento en prensa y de circulación interna.

Fitter, A. H., Graves, J. D., Watkins, N. K., Robinson, D. y Scrimgeour, C. (1998). Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhizas. *Functional Ecology*.12:406-412.

Flores- Delgadillo, L., Sommer-Cervantes, I., Alcalá-Martínez, J. y Álvarez-Sánchez, J. (1999). Estudios morfogénéticos de algunos suelos de la región de los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 16(1)81-88.

Forest Education Fundation. Changing Forest. [En línea] disponible en: <http://www.forest-education.com/images/uploads/tas-chnge-processes.jpg> (Revisado 26 de mayo de 2009).

Franklin, A. B., Barry, R. N. y Luke, G. T. (2002). What is habitat fragmentation?. *Studies in Avian Biology*. 25:20-29.

Gehring, C. A. (2003). Growth responses to arbuscular mycorrhizae by rain forest seedlings vary with light intensity and tree species. *Plant Ecology*. 167:127-139.

Guadarama-Chávez, P., Sánchez-Gallen, I., Álvarez-Sánchez, J., y Ramos Zapata, J. (2004). Hongos y Plantas, Beneficios a Diferentes Escalas en Micorrizas Arbusculares. *Revista Ciencias*. 73:39-45.

Guadarrama, P. y Álvarez-Sánchez, F. J. (1999). Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, Mexico. *Mycorrhiza*. 8:267-270.

Guadarrama, P., Álvarez-Sánchez, F. J. y Estrada-Torres, A. (2004). Phosphorus dependence in seedlings of a tropical pioneer tree: the role of arbuscular mycorrhizae. *Journal of Plant Nutrition*. 27(12)1-16.

Guevara, S., Meave, J., Moreno, P., Laborde, J. y Castillo, S. (1994). Vegetación y flora de potreros en la sierra de Los Tuxtlas, México. *Acta Botánica Mexicana*. 28:1-27.

Graw, D. (1979). The influence of soil pH on the efficiency of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*. 82:687-695.

Grubb, P. J. (1977). The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. *Botanical Review*. 52:107-145.

Harley, J.L. y Smith, S.E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press. New Jersey USA. 550 pp.

Hart, M. M. y Reader, R. J. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 153:335-344.

Hayman, D. S. (1974). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VI. Effect of light and temperature. *New Phytologist*. 73:71.

Hughes, R. F., Kauffman, J. B. y Jaramillo, V. J. (1999). Biomass, Carbon, and Nutrient Dynamics of Secondary Forest in a Humid Tropical Region of Mexico. *Ecology*. 80:1892-1907.

Ibarra-Manríquez, G. y Sinaca, S. (1995). Lista florística de la estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz. Mexico. *Revista Biología Tropical*. 43:75-115.

Ingham, E. R. y Wilson, M. V. (1999). The mycorrhizal colonization of six wetland plant species at sites differing in land use history. *Mycorrhiza*. 9:233-235.

Jakobsen, I. (1998). *Extraction and quantification of soil hyphae. Working well for soils with up to 20% clay content. Development and function of the mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi Workshop*. Uppsala Sweden.

Janos, D. P. (1980). Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae effect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology*. 61(1)151-162.

Johnson, N. (2009). Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist*. 1-17.

Jasper, D. A., Robson, A. D. y Abbott, L. K., (1987). The effect of surface mining on the infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany*. 35:6412-652.

Jasper, D. A., Abott, L. K. y Robson, A. D. (1991). The effect of disturbance on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soils from different vegetation types. *New Phytologist*. 118:471-476.

Kiers, E., Lovelock, C., Krueger E. y Herre, E. (2000). Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on roots colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecology Letters*. 3:106-113.

Lira, A. 2003. La vegetación de los potreros del norte de la sierra de Los Tuxtlas. *Tesis licenciatura*. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 98 pp.

Lovelock, C. E., Wright, S. F. y Nichols, K. A. (2004). Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. *Soil Biology y Biochemistry*. 36:1009-1012.

Luna, W. (2009) Estructura y potencial de inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares en fragmentos de diferentes tamaños de una selva alta perennifolia. *Tesis licenciatura*. Facultad de Ciencias, UNAM. 93 pp.

Núñez-Castillo, O. y Álvarez-Sánchez, F. J. (2003). Arbuscular mycorrhizae of the palm *Astrocaryum mexicanum* in disturbed and undisturbed stands of a Mexican tropical forest. *Mycorrhiza*. 13:271–276.

Núñez-Castillo, O. (2006) Efecto de borde en una selva húmeda tropical. Implicaciones en las comunidades de hongos micorrizógenos arbusculares. *Tesis de Maestría*, Facultad de Ciencias, UNAM.

Martínez-Ramos, M. (1994). Regeneración natural y diversidad de especies arbóreas en selvas húmedas. *Boletín de la Sociedad Botánica México*. 54:179-224.

Martins, M. A. (1993). The role of the external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in the carbon transfer process between plants. *Mycological. Research*. 97:807-810.

McGonigle, T.C. y Miller, M. H. (2000). The inconsistent effect of soil disturbance on colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi: a test of the inoculum density hypothesis. *Applied Soil Ecology*. 14: 147-155.

Miller, S. L. y Allen, E. B. (1992). Mycorrhizae, nutrient translocation, and interactions between plants. En: *Mycorrhizal functioning: and integrative plant-fungal process*. Editado por M. F. Allen. Chapman and Hall. New York. pp 301-325.

Miller, R.M. y Jastrow, J.D. (1998). Extraction and Quantification of External Mycorrhizal Hyphae. En: *Development and Function of the Mycelium of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Second International Conference on Mycorrhizae. Preconference Workshop Method Manual*. M. Kling, (Ed.). Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Miller, R. M. y Kling, M. (2000). The importance of integration and scale in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant soil*. 226:295-309.

Moreno, D. 2010. Estimación del Balance Hídrico en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad nacional Autónoma de México. México, D.F. 59 pp.

Morton, J.B. y Redecker, D. (2001). Two new families of glomales, archaesporaceae and paraglomaceae, with two new genera of *Archaospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*. 93:181-195.

Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Boller, T. y Wiemken, A. (2003). Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agrosystems of central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(5):2816-1824.

O'Neil, E., O'Neil, R. V. y Norby, R. J. (1991). Hierarchy theory as a guide to mycorrhizal research on large scale problems. *Environmental Pollution*. 73:271-284.

Olsen, S.R., Cole C.V., Watanabe F.S., y Dean L.A. (1954). *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate*. USDA Circ. 939. U.S. Gov. Print. Office, Washington, DC.

Olsson, P. A. y Wilhelmsson, P. (2000). The growth of external AM fungal mycelium in sand dunes and in experimental systems. *Plant soil*. 226:161-169.

Perry, D. A. (1999). Replica por Perry, D. A. *Trends in Ecology and Evolution*. 14:70-71.

Phillips, J. M. y Hayman D. S. (1970). Improve procedures for clearing roots staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of British Mycological Society*. 55:159-161.

Powers, J. S., Treseder, K. K. y Lerdau, M. T. (2005). Fine roots, arbuscular mycorrhizal hyphae and soil nutrients in four Neotropical rain forests: patterns across large geographic distances. *New Phytologist*. 165: 913-921.

Rabatin, S. C. (1979). Seasonal and edaphic variation in vesicular arbuscular mycorrhizal infection of grasses by *Glomus tenuis*. *New Phytologist*. 83:95–102.

Ramírez-Gerardo, M., Álvarez-Sánchez, J., Guadarrama, P. y Sánchez-Gallén, I. (1997). Estudio de hongos micorrizógenos arbusculares bajo árboles remanentes en un pastizal tropical. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 61:15–20.

Rilling, C. M., Wright, F. S., Nichols, A. K., Schmidt, F. W. y Torn, S. M. (2001). Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil*. 233:167-177.

Rilling, M. C., Wright, S. F. y Eviner, V. T. (2002). The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant soil*. 238:325-333.

Sánchez-Gallen, I. (1999). Efecto de la luz, de la micorrización y de los nutrientes en el crecimiento de plántulas de especies arbóreas con historias de vida contrastantes en una selva húmeda tropical. *Tesis de maestría*, Facultad de Ciencias, UNAM. 86 pp.

Sánchez-Gallen, I. Y Álvarez-Sánchez, J. (1996). Root productivity in a lowland tropical rain forest in Mexico. *Vegetatio*. 123:109-115.

Schweiger, P. F. y Jakobsen, I. (2000). Laboratory and field methods for measurement of hyphal uptake of nutrients in soil. *Plant soil*. 226:237-244.

Sharma, A.K. y Johri, B.N. (2002). Physiology of nutrient uptake by AMF. En: *Arbuscular Mycorrhizae Interactions. Plants, Rhizosphere and Soil*. Science Publishers, Inc, USA. 311 pp.

Siqueira, J.O., Carbone, M. A., Curi, N., Da Silva, S. C. y Davide, A.C. (1998) Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*. 107: 241-252.

Simard, S. W., Durall, D. y Jones, M. (2002). Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. En *Mycorrhizal ecology*. Ecol. Stud. 157:33-74.

Smith, S. E. (1980). Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biological Reviews*. 55: 475-510.

Smith, F. A., Jakobsen, I. y Smith, S. E. (2000). Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist*.147:357-366.

Smyle, R. W. y Cook, R. J. (1973). Relationship between take-all of wheat and rhizosphere pH in soils fertilized with ammonium vs nitrate-nitrogen. *Phytopathology*. 63:882-890.

Sommers-Cervantes, I., Flores-Delgadillo, L. y Gutiérrez- Ruiz, M. (2003). Caracterización de los suelos de la estación de Biología Tropical Los Tuxtlas. En: Álvarez – Sánchez, J. y Naranjo – García, E. (Eds.). *Ecología del suelo en la selva tropical húmeda de México*. UNAM e Instituto de Ecología, A.C., México. pp.17-67.

Soto, M. y Gama, L. (1997). Climas. En: González-Soriano, E., R. Dirzo y R. Vogt (Eds.). *Historia Natural de los Tuxtlas*. UNAM-CONABIO, México D.F. pp. 7-23.

Sustainable Agriculture Research and Education (SARE). The living soil. [Building Soils for Better Crops](http://www.sare.org/publications/bsbc/chap3.htm). [En línea] disponible en: <http://www.sare.org/publications/bsbc/chap3.htm> (Revisado el 26 de mayo de 2009).

Steubing, L., Alberdi, M., y Godoy, R. (2002). *Métodos de ecología vegetal*. Ed. Univ. Primera edición, Santiago de Chile. pp. 302-303

Sylvia, D. (1992). Quantification of External Hyphae of Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi. En: *Techniques for mycorrhizal research methods in Microbiology*. Norris, J. R. (Ed.). Academic Press. Harcourt Brace y Company Publishers. London. pp. 9-17.

Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P. y Zuberer, A. (1999). *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ. 550 pp.

Treseder, K. K. y Allen, M. F. (2002). Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytologist*. 155:507-515.

Van Hoewyk, D., Wigand, C. y Groffman, P. M. (2001). Endomycorrhizal colonization of *Dasiphora floribunda*, a native plant species of calcareous wetlands in Eastern New York state, USA. *Wetlands* 21:431-436.

Varela, L., Estrada-Torres, A., Álvarez-Sánchez, J. y Sánchez-Gallen, I. (2008). *Catálogo ilustrado de hongos micorrizógenos arbusculares de la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas*. CD. SEMARNAT-CONACYT. GEF. TSBF. CIAT. Instituto de Ecología, A.C. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

Velázquez, A., Mas, J.F., Díaz-Gallegos, J.R., Mayorga-Saucedo, R., Alcántara, P.C., Castro, R., Fernández, T., Bocco, G., Ezcurra, E. y Palacios, J.L. (2000). Patrones y tasas de cambio de uso del suelo en México. *Gaceta Ecológica*. 62:21-37.

Walker, C. (1992). Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) a possible way forward. *Agronomie*. 12:887-897.

Waters, J. R. y Borowicz, V. A. (1994). Effect of clipping, benomyl, and genet on C¹⁴ transfer between mycorrhizal plants. *Oikos*. 71:246-252.

Watkins, N. K., Fitter, A. H., Graves, J. D. y Robinson, D. (1996). Carbon transfer between C₃ and C₄ plants linked by a common mycorrhizal network, quantified using stable carbon isotopes. *Soil Biology and Biochemistry*. 28(4-5):471-477.

Whitbeck, J. L. (2001). Effects of light environment on vesicular-arbuscular mycorrhiza development in *Inga leiocalycina* a tropical forest tree. *Biotropica*. 33(2):303-311.

Wilkinson, D. M. (1998). The evolutionary ecology of mycorrhizal networks. *Oikos*. 82:407-410.

Zabinski, C. A., Quinn, L. y Callaway, R. M. (2002). Phosphorus uptake, not carbon transfer, explains arbuscular mycorrhizal enhancement of *Centaurea maculosa* in the presence of native grassland species. *Functional Ecology*. 16:758-765.

Zangaro, W., Bononi, V. L. R. y Trufen, S. B. (2000). Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. *Journal of Tropical Ecology*. 16: 603-622.

Zar, J. H., (1999). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. Englewood Cliffs, Nueva Jersey. 663 pp.

Zhi-Wei, Z., Yong-Mei, X., Xin-Zheng, Q., Xi-Wu, L., Li-Zhong, Ch., Tao, S. y Guo-Hua, W. (2001). Arbuscular mycorrhizal status of plants and the spore density of arbuscular mycorrhizal fungi in the tropical rain forest of Xishuangbanna, southwest China. *Mycorrhiza*. 11:159-162.

APENDICE 1

Listado florístico de las especies vegetales encontradas en los ambientes muestreados (Ibarra y Sinaca 1995).

SELVA

| | | | |
|------------------------------------|------|-------------------------|----|
| • <i>Alchornea latifolia</i> | • TS | | |
| • <i>Astrocaryum mexicanum</i> | • TS | TOLERANTE A LA SOMBRA | TS |
| • <i>Brosimum alicastrum</i> | • TS | | |
| • <i>Cecropia obtusifolia</i> | • TS | DEMANDANTE DE LUZ | DL |
| • <i>Cedrela odorata</i> | • TS | | |
| • <i>Chamaedorea alternans</i> | • TS | | |
| • <i>Chamaedorea pinnatifron</i> | • TS | | |
| • <i>Coccoloba hondurensis</i> | • TS | | |
| • <i>Cojoba arborea</i> | • DL | | |
| • <i>Dendropanax arboreus</i> | • TS | | |
| • <i>Dussia Mexicana</i> | • TS | | |
| • <i>Inga acrocephala</i> | • TS | Total de especies | 23 |
| • <i>Myriocarpa longipes</i> | • DL | | |
| • <i>Omphalea oleifera</i> | • DL | Demandantes de luz | 6 |
| • <i>Piper sanctum</i> | • TS | | |
| • <i>Poulsenia armata</i> | • TS | Tolerantes a la sombra | 17 |
| • <i>Pseudolmedia oxyphyllaria</i> | • TS | | |
| • <i>Psychotria chiapensis</i> | • DL | <u>Mayor abundancia</u> | 10 |
| • <i>Rheedia edulis</i> | • TS | | |
| • <i>Siparuna andina</i> | • DL | | |
| • <i>Tabernamontana arborea</i> | • TS | | |
| • <i>Tetrorchidium rondatum</i> | • DL | | |
| • <i>Trophis mexicana</i> | • TS | | |

APENDICE 1 Continuación

CLARO

| | | | |
|--|------|-------------------------|----|
| • <i>Alchornea cracifolia</i> | • TS | | |
| • <i>Alchornea latifolia</i> | • TS | TOLERANTE A LA SOMBRA | TS |
| • <i>Carica papaya</i> | • DL | | |
| • <u><i>Cecropia obtusifolia</i></u> | • DL | DEMANDANTE DE LUZ | DL |
| • <i>Cestrum nocturnum</i> | • DL | | |
| • <i>Cestrum racemosum</i> | • DL | SIN REFERENCIA | SR |
| • <i>Citharexylum affine</i> | • SR | | |
| • <i>Cojoba arborea</i> | • DL | | |
| • <i>Costus dirzoi</i> | • DL | | |
| • <i>Costus scaber</i> | • DL | | |
| • <i>Erythrina folkersii</i> | • TS | | |
| • <i>Eupatorium galeottii</i> | • SR | | |
| • <i>Faramea occidentalis</i> | • DL | | |
| • <i>Guamia sp.</i> | • DL | | |
| • <i>Hamelia longipes</i> | • TS | Total de especies | 39 |
| • <u><i>Hampea nutricia</i></u> | • TS | | |
| • <i>Heliconia sp.</i> | • DL | Demandante de luz | 24 |
| • <i>Heliocarpus appendiculatus</i> | • DL | | |
| • <u><i>Lycianthes heteroclita</i></u> | • TS | Tolerantes a la sombra | 14 |
| • <i>Myriocarpa longipes</i> | • DL | | |
| • <i>Nectandra ambigens</i> | • TS | <u>Mayor abundancia</u> | 6 |
| • <i>Neurolaena sp.</i> | • DL | | |
| • <i>Ochroma pyramidal</i> | • DL | | |
| • <i>Phytolacca rivinoides</i> | • DL | | |
| • <i>Pleuranthodendron lindenii</i> | • DL | | |
| • <i>Poulsenia armata</i> | • TS | | |
| • <i>Pouteria sapota</i> | • TS | | |
| • <i>Pseudolmedia oxyphyllaria</i> | • TS | | |
| • <i>Psychotria halepensis</i> | • DL | | |
| • <i>Pterocarpus rhorii</i> | • DL | | |
| • <i>Renealmia mexicana</i> | • SR | | |
| • <i>Senna mulijuga</i> | • DL | | |
| • <u><i>Siparuna andina</i></u> | • TS | | |
| • <i>Solanum racemoses</i> | • DL | | |
| • <i>Solanum schlechtendalianum</i> | • DL | | |
| • <i>Solanum sp.</i> | • DL | | |
| • <i>Stemmadenia donell-smithii</i> | • DL | | |
| • <i>Tapirira mexicana</i> | • TS | | |
| • <i>Trophis mexicana</i> | • TS | | |
| • <u><i>Urera caracasana</i></u> | • DL | | |
| • <u><i>Urera elata</i></u> | • TS | | |
| • <i>Vernonia patens</i> | • SR | | |

APENDICE 1 Continuación

PASTIZAL

| | | | |
|-------------------------------------|------|-------------------------|----|
| • <i>Cynodon plectostachyus</i> | • DL | TOLERANTE A LA SOMBRA | TS |
| • <u><i>Ichnantus nemorosus</i></u> | • SR | | |
| • <i>Licthacne sp.</i> | • SR | DEMANDANTE DE LUZ | DL |
| • <i>Panicum laxum</i> | • DL | | |
| • <i>Panicum pilosum</i> | • DL | SIN REFERENCIA | SR |
| • <i>Panicum trichoides</i> | • DL | | |
| • <i>Paspalum conjugatum</i> | • DL | | |
| | | Total de especies | 7 |
| | | Demandante de luz | 5 |
| | | Tolerantes a la sombra | 0 |
| | | <u>Mayor abundancia</u> | 1 |

APENDICE 2

Tinción y cuantificación de la colonización intraradical.

El método utilizado para la tinción de raíces micorrizadas es el de tinción con Azul de Tripano, descrito por Phillips y Hayman (1970) en el cual el procedimiento a seguir es el siguiente:

- a. Lavar las raíces con abundante agua corriente.
- b. Se ponen en rejillas con las raíces en un recipiente para su tratamiento químico, procurando que éstas no lleguen hasta el tope.
- c. Se cubren las raíces con solución de KOH al 10%.
- d. Se coloca el recipiente con las raíces a baño maría (90°C) durante 10 a 15 minutos.
- e. Se lavan las rejillas con agua corriente, utilizando preferiblemente un tamiz adecuado para evitar pérdidas durante el enjuague; se lavan y se dejan en agua oxigenada al 10%. Se revisan aproximadamente a los 15 minutos para verificar la decoloración de las raíces; si no es total se pueden dejar unos minutos más.
- f. Las raíces se lavan con agua corriente y se agrega una solución de HCl al 1N durante 10-15 minutos.
- g. Se decanta el HCl sin lavar con agua y se adiciona el Azul de Tripano al 0.05% hasta que tape la totalidad de las rejillas; se dejan teñir toda la noche.
- h. Por último se montan las raíces en un portaobjetos calculando una longitud de las raíces de un centímetro y medio tratando de colocar de 15-20 raíces por laminilla.
- i. La determinación del porcentaje de colonización, se basa en la observación microscópica de segmentos teñidos de raíces. Se hacen tres barridos, uno arriba, uno en medio y uno abajo con el objetivo 40x; se cuantifican aquellos campos de observación que presentan estructuras fúngicas (hifas, arbusculos, vesículas y ovillos), al igual que los segmentos no colonizados.
- j. Se obtienen los porcentajes de colonización total y por estructura.

APENDICE 3

Extracción de micelio externo

Se realizó con la técnica de Miller y Jastrow *et al.* (1998). La técnica se modificó debido a la abundancia de MO y a la cantidad de arcillas en el suelo. El volumen de la alícuota que se resuspende aumento de 6 ml a 12 ml, y se eliminó la aplicación de calor al momento de la agitación y en lugar del vortex se utilizó un agitador de plancha. El procedimiento se detalla a continuación:

- a. Se toman 5g de suelo previamente secado al ambiente y tamizado con un tamiz del numero 10.
- b. El suelo tamizado se coloca en un frasco transparente de plástico de 500ml con tapa.
- c. Se agregan 250ml de agua y 31ml de hexametáfosfato de sodio.
- d. El suelo y las soluciones se agitan con una barra de vidrio, tratando de mover todo el suelo asentado en el fondo del frasco, se enjuaga la varilla cada vez que se usa para evitar contaminación en las muestras, o se pueden utilizar varias varillas para cada muestra de suelo.
- e. Se ponen un agitador dentro del recipiente a velocidad máxima por 3 minutos, después se reduce a velocidad media por otros 3 minutos.
- f. Se toman 12ml, tratando de tener la pipeta en medio del frasco y que la solución no este asentada; si es posible toma la muestra inmediatamente después de que el agitador se detuvo. Se transfiere la muestra a otro frasco de plástico de 500ml.
- g. Se agregan otros 250ml de agua y 31ml de hexametáfosfato de sodio.
- h. Se vuelve a poner en un agitador a velocidad máxima por 3 minutos, después se reduce a velocidad media por otros 3 minutos.
- i. Se toman dos alícuotas de 20ml cada una, evitando tomar del fondo del recipiente y procurando que sea inmediatamente después que el agitador se detuvo, las alícuotas se ponen en tubos de centrifuga de 50ml.
- j. Los tubos se centrifugan a 1000 rpm x g de suelo x 8 min.
- k. Con cuidado se descarta el sobrenadante.
- l. Se agregan 10ml de glicerina al 50%, tratando de resuspender la alícuota.
- m. Se vuelve a centrifugar a 75rpm x g de suelo x 30 s.
- n. Se filtra en vacío, utilizando una membrana de nitrocelulosa de 45µm de apertura. Previamente se debe armar el equipo de la bomba de vacío, si es que en el laboratorio no se cuenta con una conexión directa. Solo se puede filtrar una muestra a la vez, ya que las bombas que cuentan con más entradas para filtrar en vacío no tienen la suficiente fuerza para filtrar tantas muestras a la vez de suelo arcilloso.

- o. Cuando la muestra ya esta filtrada se agregan 5ml de azul de tripano al 0.05% y se deja que se filtre solo por la membrana. Cuando no haya solución de azul de tripano se prende la bomba de vacío para quitar exceso de colorante; si la muestra tiene mucha arcilla o materia orgánica, se puede intentar filtrar con la bomba desde que se añade el azul, sin embargo la coloración no se observa tan homogénea.
- p. Por último la membrana se monta sobre un portaobjetos con unas gotas de permount, y se deja secar.

APENDICE 4

Cuantificación de micelio extrarradical total

La cuantificación se realizó por medio de la técnica utilizada por Jakobsen (1998), con la modificación en cuanto al número de observaciones por muestra de 25 a 70 observaciones; el volumen de la alícuota se aumentó de 3 a 12ml.

- a. Medir la longitud de la unidad de la rejilla en el ocular de 10x10 sobre el filtro, en mm, usando un objetivo micrométrico.
- b. La longitud total de la hifa sobre el área de filtrado cubierta por 25 rejillas (H):
$$H = 11/14 \times N \times \text{unidad de rejilla} \quad (\text{mm})$$

Donde N = número total de interseptos en 25 campos de observación.
- c. Determinar el área filtrable sobre el filtro (FA) en mm^2 .
- d. Calcular el área filtrada cubierta por las 25 unidades de observación (área contable CA):
$$CA = (10 \times \text{unidad de rejilla})^2 \times 70 \quad (\text{mm}^2)$$
- e. Calcular la longitud total de la hifa sobre un filtro (HL):
$$HL = (H / CA) \times FA \quad (\text{mm})$$
- f. Calcular el total de la hifa en la muestra de suelo (TL):
$$TL = ((HL / 12\text{ml}) \times 250\text{ml}) / 5\text{g} \quad (\text{mm/g})$$

Dónde: 5g es el peso de la muestra de suelo seco, 250ml es el volumen de agua donde la muestra fue suspendida y 12ml es la alícuota de la suspensión pipeteada del suelo sobre el filtro.
- g. Tomar la media de los valores TL dados para las 2 submuestras x 2 filtros por muestra de suelo.

APENDICE 5

Cuantificación de biomasa radical

Uno de los métodos más utilizados para el estudio de los sistemas radicales, consiste en extraer muestras de suelo con raíces mediante cilindros metálicos o PVC de 5cm de largo y 3.8 de diámetro. Las raíces se separan posteriormente con ayuda de un tamiz, bajo agua corriente y se clasifican (por especie, vitalidad o diámetro) bajo un microscopio estereoscópico

Se realiza un hoyo hasta la profundidad deseada. Desde el horizonte superficial y con repeticiones a cada 10 cm o 5 cm, se introduce cuidadosamente un cilindro en el suelo, luego se extrae el cilindro, para después extraer el volumen de suelo con raíces y se deposita en una bolsa de plástico rotulada.

En el laboratorio se procede a depositar en forma independiente cada muestra en una bandeja con agua, para facilitar el desprendimiento de raíces del suelo. Luego la muestra se vierte a un tamiz y bajo agua corriente con ayuda de pinzas se obtienen las raíces limpias, las que se depositan en un envase con agua para su estudio. Posteriormente bajo microscopio se separan las raíces finas (menor o igual a 3mm) y gruesas (mayor a 3mm). No se diferenciaron entre raíces vivas o muertas. Se trasladan las raíces a bolsas de papel para secarse a 105°C, después se pesan y se anota el peso seco de las raíces. Se determina el área y volumen del cilindro para expresar los resultados en gramos de peso seco de raíces por volumen del cilindro (Steubing *et al.* 2002).

APENDICE 6

Técnicas de análisis de nutrientes

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Fertilidad del Colegio de Postgraduados.

La concentración de Carbono se realizó por combustión seca en un analizador automático de carbono Shimadzu TOC5000-A, para lo cual se sigue el procedimiento de operación definido por el fabricante y los procedimientos operativos de control de calidad del Laboratorio de Edafología y Fertilidad de Suelos del Colegio de Postgraduados, Chapingo (Etchevers *et al.* 2005).

La determinación de la concentración de Nitrógeno se llevó a cabo por digestión húmeda con la mezcla ácida sulfúrico-salicílico, y destilación semi-micro Kjeldahl por arrastre de vapor y titulación con ácido sulfúrico 0.05 N, de acuerdo con los métodos usados por el Laboratorio de Edafología y Fertilidad de Suelos del Colegio de Postgraduados (Bremmer 1965, Etchevers 1992).

La concentración de fósforo disponible (P Olsen), se realizó mediante la extracción del P con NaHCO_3 0.5 M pH 8.5 y determinación colorimétrica mediante el complejo azul de molibdeno (fosfórico molibdico con ácido ascórbico) (método Olsen) (Olsen *et al.* 1954).