



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estructura y potencial de inóculo de hongos
micorrizógenos arbusculares en fragmentos de
diferentes tamaños de selva alta perennifolia**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

WENDY BERENICE LUNA GONZÁLEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTOR: M. EN C. IRENE SÁNCHEZ GALLEN

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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
Luna
González
Wendy Berenice
56 22 48 35
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099174800
2. Datos del tutor
M. en C.
Irene
Sánchez
Gallen
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Francisco Javier
Álvarez
Sánchez
4. Datos del sinodal 2
Dra.
María Patricia
Guadarrama
Chávez
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Arcadio
Monroy
Ata
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Laura Verónica
Hernández
Cuevas
7. Datos del trabajo escrito
Diversidad y potencial de inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares en fragmentos de diferentes tamaños de selva alta perennifolia.
93 p.
2009

D e d i c a t o r i a

A mis padres, por creer en mí y estar conmigo siempre a pesar de la distancia, los amo.

A mi hermana Gaby, por compartir conmigo toda una vida, por apoyarme y escucharme cuando más la he necesitado, ¡gracias!

A mi pequeña hermana Diana, por ser parte de mi vida y quererme mucho ¡Te amo, Diana!

A Dany, por su apoyo incondicional, paciencia y amor durante todos estos años.

Agradecimientos

A la M. en C. Irene Sánchez Gallen por su apoyo y asesoría constante durante la realización de la tesis, además por sus consejos, dedicación y paciencia.

A mis sinodales Dr. Javier Álvarez, Dra. Patricia Guadarrama, Dr. Arcadio Monroy y a la M. en C. Laura Hernández por sus valiosos comentarios que mejoraron la tesis.

A la M. en C. Laura V. Hernández Cuevas por la identificación de las esporas.

A la Dra. Patricia Guadarrama por su asesoría para la extracción de las esporas y en el montaje del experimento del número más probable.

A la M. en C. Audra Patterson por su enseñanza de la técnica de extracción de esporas.

A Julio Romero Martínez por su ayuda y asesoría en el montaje del experimento en invernadero.

Al Biól. Erwin Piñón Pensamiento por la germinación de semillas en el laboratorio.

A la Biól. Laura Patricia Olguín Santos, técnico académico de la Unidad de Ambientes Controlados por facilitar el uso del invernadero de la Facultad de Ciencias, así como por proporcionar los registros de la temperatura y humedad relativa correspondiente al tiempo que permaneció el experimento dentro de las instalaciones.

Al Biól. Marco Antonio Romero Romero, técnico académico del laboratorio de Ecología y Recursos Naturales por su ayuda en el manejo de los programas de cómputo.

A la Biól. Dulce María Moreno Miranda por la elaboración del mapa de los sitios de colecta.

A Irene, Nelly e Isela por su apoyo en la recolección de las muestras de suelo en campo.

A Oswaldo Núñez, Diego Olivera, Ernesto Delgadillo e Isela Jasso por su ayuda en el montaje y cosecha del experimento en el invernadero.

A Daniel Beltrán por su ayuda en el procesamiento y montaje de muestras de raíces.

A los trabajadores de la Estación de Biología por las facilidades otorgadas para mi estancia durante el muestreo.

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

A Javier Álvarez, por el apoyo y confianza que me ha brindado durante estos años de conocerme.

A Juan Carlos Peña, un especial agradecimiento por su apoyo moral e incondicional durante la finalización de la tesis.

A Ibeth, sabes que eres mi mejor amiga de la carrera, gracias por tu apoyo y amistad en todo momento, te quiero mucho!

A Ana, por haber compartido conmigo tantas buenas y malas experiencias y por seguir siendo una querida amiga, aún, cuando hemos tomado caminos diferentes, te extraño!

A Javier y Gustavo mis queridos amigos de la prepa, por ser parte de los buenos momentos de mi vida.

A mis abuelos, Guille y Rubén, por quererme y apoyarme siempre, como si fuera su hija, ¡los quiero!

A Silvia, gracias por tus consejos y ayuda, siempre puedo contar contigo.

ÍNDICE

Resumen.....	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Hongos micorrizógenos arbusculares	5
1.1.1 Generalidades.....	5
1.1.2 Clasificación taxonómica.....	7
1.1.4 Propágulos y potencial de inóculo de la comunidad de HMA	10
1.1.5 Factores que influyen en la estructura y potencial de inóculo de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares	12
1.1.5.1 Factores abióticos.....	12
1.1.5.2 Factores bióticos	15
1.1.6 La comunidad de HMA de la región de los Tuxtlas	16
2. ANTECEDENTES.....	19
2.1 Estudios sobre potencial de inóculo en las selvas	19
2.1.1 Estudios sobre potencial de inóculo en las selvas en México	22
2.2 Estructura de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares en fragmentos de selva de diferente tamaño	24
2.2.1 Estructura de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares en la región de Los Tuxtlas	25
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo general	29
3.2 Objetivos particulares	29
4. HIPÓTESIS	29
5. MÉTODOS	30
5.1 Área de estudio	30
5.1.1 Clima	31
5.1.2 Suelo	31
5.1.3 Vegetación.....	33
5.1.4 Sitios de colecta	34
5.2 Trabajo de campo.....	36
5.3 Invernadero	37
5.4 Trabajo de laboratorio.....	38
5.4.1 Extracción, abundancia e identificación de esporas	38
5.4.2 Número de propágulos infectivos y colonización micorrízica.....	39
5.5 Análisis de datos.....	40
5.5.1 Esporas de hongos micorrizógenos arbusculares.....	40
5.5.2 Porcentaje de colonización micorrízica de HMA.....	41
5.5.3 Determinación del número más probable de propágulos infectivos de HMA	41
6. RESULTADOS	42

6.1 Estructura de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) del inóculo proveniente de fragmentos de dos tamaños diferentes	42
6.1.1 Riqueza y abundancia de esporas de HMA	42
6.1.2 Número de esporas.....	49
6.1.3 Índices de diversidad y similitud	53
6.2 Potencial de colonización del inóculo de HMA en fragmentos de diferentes tamaños	54
6.2.1 Porcentaje de colonización total en función del número de propágulos infectivos.....	54
6.2.2 Porcentaje de colonización total en función de la dilución	56
7. DISCUSIÓN	61
7.1 Composición de la comunidad de HMA	61
7.2 Número más probable de propágulos infectivos y potencial de colonización de HMA	67
7.3 Técnica del número más probable de propágulos infectivos.....	71
8. CONCLUSIONES.....	72
9. PERSPECTIVAS	73
10. LITERATURA CITADA	74
Apéndice 1. Técnica del número más probable (Porter, 1979).....	86
Apéndice 2. Tamizado húmedo, decantación y gradientes de densidad (modificado de Brundett <i>et al.</i>, 1996)	90
Apéndice 3. Técnica de tinción de raíces (Phillips y Hayman, 1970)	91
Apéndice 4. Técnica de colonización micorrízica (Mc Gonigle <i>et al.</i>, 1990)	92

Resumen

En la región de Los Tuxtlas, Veracruz, los procesos de deforestación y fragmentación de la selva alta perennifolia afectan de manera general la estructura y funcionamiento de la comunidad de plantas; dada la relación de ésta con la comunidad de Hongos Micorrizógenos Arbusculares (HMA) en el suelo, también pueden verse afectados su composición, abundancia y potencial de inóculo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la estructura y el potencial de colonización del inóculo de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares en fragmentos de selva de diferente tamaño. Se seleccionaron tres fragmentos chicos de 3, 5 y 7 hectáreas y, dos grandes de 211 y 640 hectáreas de selva alta perennifolia.

Para determinar la estructura de la comunidad de HMA se analizaron la riqueza y abundancia de esporas en fragmentos chicos y grandes durante la época de secas en 2006. Se colectaron al azar 15 muestras de suelo por fragmento el cual fue mezclado para obtener 15 muestras compuestas para los chicos y 15 para los grandes. Las esporas fueron aisladas, montadas, cuantificadas e identificadas. Se identificaron 19 especies pertenecientes a cinco géneros: *Glomus*, *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. Los fragmentos chicos presentaron el mayor número de esporas promedio con 20.14 (± 13.86) y los grandes de 19.81 (± 13.3).

Para evaluar el potencial de inóculo de HMA, se estimó el número de propágulos infectivos y su potencial de colonización en fragmentos chicos y grandes durante la época de lluvias en 2007. Para ello, se colectó el suelo de 6 puntos por cada fragmento y fue mezclado para obtener una muestra compuesta para cada uno de ellos; en total tres muestras para fragmentos chicos y dos para los grandes. Se aplicó el método del número más probable y finalmente se determinó el porcentaje de colonización micorrízica. Se aplicó un ANOVA de dos vías para analizar las diferencias entre los factores (dilución y sitio). En promedio se obtuvieron 9 246 ($\pm 3 991.7$) propágulos en 50g de suelo

para fragmentos chicos y 12 709 ($\pm 3\ 436.3$) para los grandes. Los fragmentos chicos tuvieron un porcentaje de colonización total promedio de 32% (± 5.03), mientras que los grandes tuvieron un porcentaje de 21.67 (± 3.36). El análisis de varianza fue significativo para ambos factores. Los mayores porcentajes de colonización se obtuvieron en suelo sin diluir, mientras que los menores se presentaron para el suelo más diluido, sin importar el tamaño del fragmento.

Se concluye que el tamaño del fragmento no influye sobre la composición y potencial de inóculo de HMA y que los fragmentos mejor conservados, aún cuando posean una superficie menor, pueden sostener una gran riqueza de especies de HMA, así como un alto número de propágulos infectivos y, de potencial de colonización.

1. INTRODUCCIÓN

La fragmentación de la selva alta perennifolia, efecto inmediato de su deforestación, ha traído graves implicaciones para este ecosistema dado que ya no es un continuo sino una serie de fragmentos de diferentes tamaños rodeados de una matriz de condiciones ambientales diferentes a la vegetación nativa, lo que trae como resultado alteraciones en las condiciones microambientales internas de los fragmentos y pérdida de hábitat, que se pueden agudizar a medida que disminuye el tamaño de éstos. Bajo este panorama, la pérdida de la diversidad vegetal y animal, así como la erosión del suelo y el disminución del aporte de materia orgánica es mayor conforme el tamaño del fragmento disminuye. Asimismo, los microorganismos del suelo se pueden ver afectados y entre ellos los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), que están asociados con las raíces de la mayoría de las plantas y que son de vital importancia para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres, ya que a través de sus hifas extrarradicales aumentan la capacidad de absorción de nutrientes y de agua requeridos por la planta para su establecimiento y desarrollo.

1.1 Hongos micorrizógenos arbusculares

1.1.1 Generalidades

Los hongos del phylum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) son cosmopolitas ya que se encuentran en la mayoría de los hábitats (Gerdemann y Nicolson, 1963), sin embargo, están más ampliamente distribuidos y ocurren con mayor frecuencia en los trópicos, de ahí que sea de especial interés estudiarlos en dichos ecosistemas (Janos, 1980a; Smith y Read, 1997).

Estos organismos son simbioses obligados que establecen una asociación con las raíces del 90% de las plantas terrestres, angiospermas, gimnospermas, pteridofitas y briofitas llamada micorriza arbuscular (Smith y Read, 1997; van der Heijden y Sanders, 2002). Esta asociación es mutualista debido a que el balance beneficio-costos es positivo, es decir, los beneficios son mayores que las

pérdidas. Por un lado, los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) exploran a través de sus hifas extrarradicales el suelo, de tal manera que aumentan la superficie de absorción de nutrientes por parte de las plantas, principalmente del fósforo que es relevante por ser un factor limitante en las zonas tropicales (George *et al.*, 1995; Smith y Read, 1997; Schüßler *et al.*, 2001; Redecker, 2008), además, junto con los nutrientes transportan agua que beneficia el estado hídrico de las plantas (Newsham *et al.*, 1995); por otro lado, son capaces de intervenir en la producción de hormonas como el ácido absícico y reducen el daño en las plantas por patógenos de las raíces y herbívoros (Linderman, 1988). A su vez, los HMA obtienen de las plantas los carbohidratos necesarios para su supervivencia, así como un hábitat donde pueden desarrollarse (Allen, 1991; Smith y Read, 1997; Schüßler *et al.*, 2001; Redecker, 2008).

Los HMA no forman una estructura especializada de reproducción, sino sólo estructuras de resistencia que son esporas asexuales, solas, agregadas, formando esporocarpos (Morton, 1988) o, en muy pocas ocasiones, dentro de las raíces de las plantas; las esporas germinan en el suelo y, al contacto con una raíz, forman el apresorio que es la estructura que permite penetrar las células corticales de la planta hospedera sin modificar la estructura radical (Redecker, 2008); las hifas, que carecen de septos, invaginan el plasmalema de cada célula de la corteza radical y la penetran o producen una estructura profusamente ramificada llamada arbúsculo, que es donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta. Algunos géneros de HMA forman estructuras de almacenamiento dentro de las células corticales llamadas vesículas, las cuales contienen abundantes lípidos (Allen, 1991; Smith y Read, 1997; Redecker, 2008).

Todas estas estructuras están conectadas con un micelio extrarradical que tiene diferentes funciones (Friese y Allen, 1991), como la formación de esporas, de hifas corredoras, la exploración del

suelo y la captación de nutrientes y agua (Bago *et al.*, 2000; Villegas y Fortín, 2001). Dentro de las estructuras de los HMA, las esporas, el micelio y las raíces colonizadas se pueden considerar sus propágulos (Biermann y Linderman, 1983; Friese y Allen, 1991; Ritcher *et al.*, 2002). Las esporas, siendo estructuras de resistencia, pueden tolerar condiciones de estrés como la disminución de humedad y depredación por otros organismos del suelo; además de dispersarse y colonizar nuevos hábitats gracias a su transporte en el tracto digestivo de algunos insectos, lombrices y roedores (Allen, 1991).

1.1.2 Clasificación taxonómica

Anteriormente los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) formaban parte del grupo Glomales clasificados en el phylum Zygomycota; actualmente se les considera como un phylum aparte, el Glomeromycota, con cuatro órdenes y once familias (Figura 1), con base en el análisis de la subunidad pequeña que codifica para el ARN ribosomal (Schüßler *et al.*, 2001).

Phylum Glomeromycota

Orden Glomerales

Familia Glomeraceae

Orden Diversisporales

Familia Acaulosporaceae

Entrophosporaceae

Gigasporaceae

Pacisporaceae

Diversisporaceae

Orden Archaesporales

Familia Archaeosporaceae

Appendicisporaceae

Orden Paraglomerales

Familia Paraglomeraceae

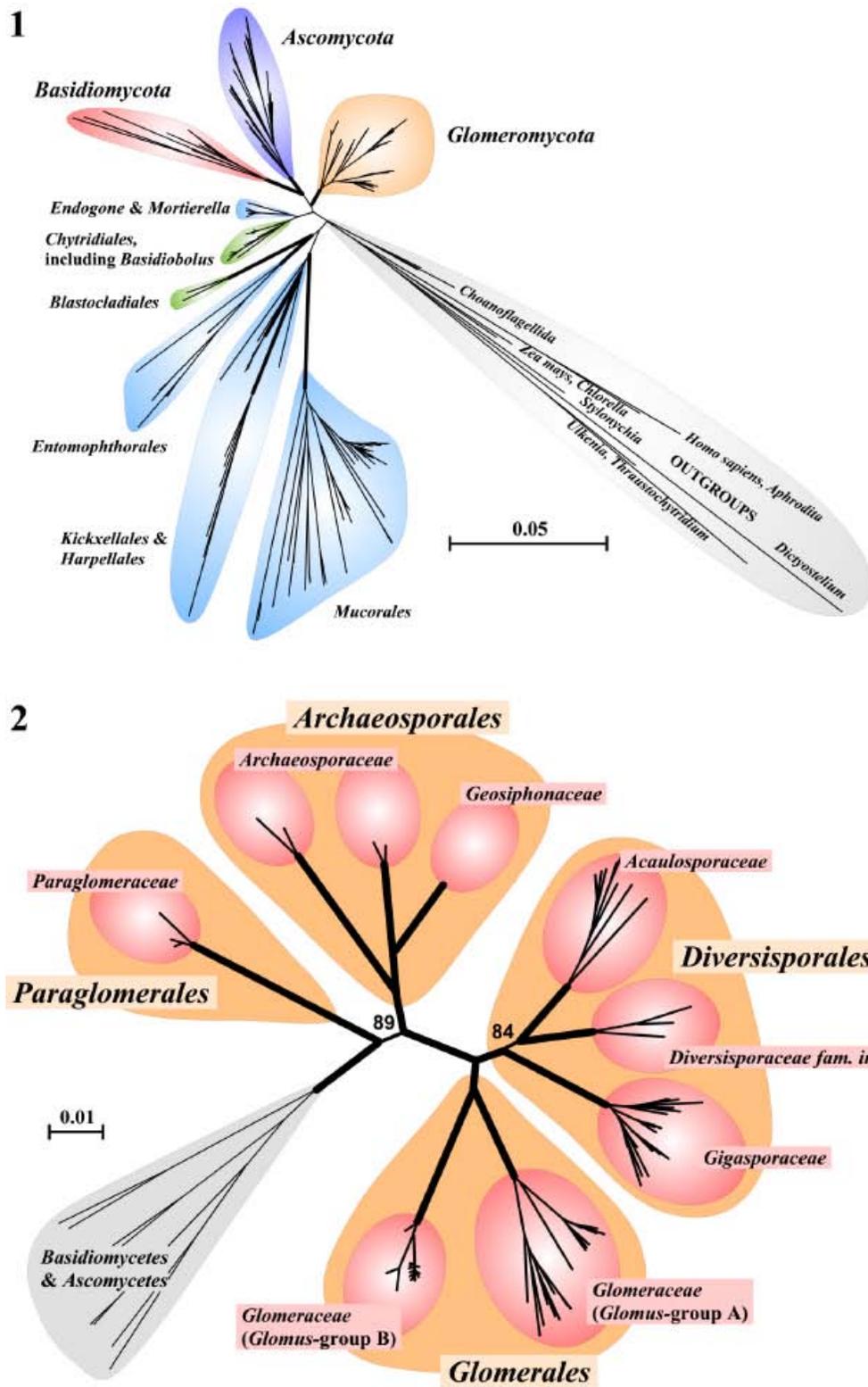


Figura 1. Árbol filogenético de los hongos micorrizógenos arbusculares. 1) Principales grupos monofílicos del reino Fungi, entre ellos destaca el Phylum Glomeromycota como un grupo separado. 2) Estructura de los cuatro órdenes y familias del Phylum Glomeromycota, entre ellos el reciente orden Archaeosporales y dos nuevas familias dentro del orden Glomerales (*Glomus* grupos A y B) (tomado de Schüßler *et al.*, 2001).

1.1.3 La relación planta-hongo micorrizógeno arbuscular: beneficios desde individuo hasta ecosistema

Además de la importancia que tienen estos hongos en la absorción de nutrientes, los HMA aportan otros beneficios a los ecosistemas. La resistencia contra el estrés hídrico la logran a través de la formación de una extensa red hifal que se forma entre las raíces de las plantas y las partículas del suelo, la cual previene la formación de claros entre ellas y con ello la pérdida de agua; además, las hifas extrarradicales incrementan la superficie de absorción de agua, de tal manera que la planta micorrizada tiene un mejor estado hídrico que las que no tienen HMA, lo cual favorece el establecimiento, productividad y supervivencia de las plantas en ecosistemas con condiciones limitadas de agua (Augé, 2001). De igual manera, las hifas externas de los HMA contribuyen a la estabilidad del suelo mediante la secreción de una proteína llamada glomalina que promueve la adhesión de partículas de suelo y la formación de agregados (mayores a 250 μm) con poros grandes, capaces de retener suficiente agua y prevenir así la erosión (Wright y Upadhyaya, 1998). Asimismo, los HMA junto con otros organismos producen compuestos húmicos que aceleran la descomposición de minerales primarios y secretan azúcares capaces de unir granos minerales y homogeneizar partículas finas del suelo, como arcillas y humus que mantienen la porosidad del suelo (Rillig y Mummey, 2006).

La asociación HMA-planta, le confiere a esta última una mayor protección contra patógenos (Linderman, 1988; Newsham *et al.*, 1994; Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Filion *et al.*, 1999), es decir, la planta puede resistir y recuperarse rápidamente del ataque de ciertos depredadores, además, los HMA pueden afectar las comunidades de patógenos radicales, disminuyendo sus poblaciones, la cantidad de propágulos infectivos y el grado de colonización a través de diversos mecanismos como la ocupación de un espacio en la raíz y la producción de exudados (Barea *et al.*, 2005).

En fechas recientes se ha encontrado que existe un nivel de afinidad fisiológica entre una especie de HMA y una especie vegetal, es decir, a pesar de que se sabe que un HMA es capaz de colonizar una gran cantidad de especies de plantas y una especie de planta puede ser colonizada, a la vez, o en diferentes fases de su ciclo de vida, por muchas especies de HMA, se ha demostrado que sólo cierta especie de hongo proporciona más beneficios a una especie determinada de planta y viceversa (Bever, 2002; van der Heijden y Sanders, 2002; Hart *et al.*, 2003). Este hecho explica, en mucho, cómo la diversidad vegetal está directamente correlacionada con la diversidad fúngica, por lo que factores que afectan la estructura vegetal pueden afectar también la estructura de la comunidad de HMA, disminuyendo el número de especies y cambiando la composición, siendo esto, a su vez, un factor determinante para la conservación de la diversidad vegetal, la variabilidad del ecosistema y la productividad vegetal (van der Heijden *et al.*, 1998).

1.1.4 Propágulos y potencial de inóculo de la comunidad de HMA

Cuando alguno de los propágulos (esporas, micelio y raíces colonizadas) entra en contacto con una raíz activa y es capaz de colonizarla entonces se desarrolla una colonización primaria. Esta capacidad de dichos propágulos de formar la asociación micorrízica con las raíces de las plantas de un suelo dado, se denomina potencial de inóculo (Brundrett y Abbott, 1995), sin embargo, no todos los propágulos son igualmente infectivos y efectivos (Klironomos y Hart, 2002). Diversos autores han indicado que el potencial de inóculo de un sitio está directamente relacionado con la cantidad de propágulos en el suelo (Sanders y Sheik, 1983; Walker y Smith, 1984; Franson y Bethlenfalvay, 1989; Kiers *et al.*, 2000), y han señalado que conforme se incrementa el número de propágulos en el suelo, el nivel de colonización se incrementa y viceversa, que una disminución en su número disminuye el nivel de colonización (Carling *et al.*, 1979).

El potencial de inóculo puede ser estimado a través del conteo específico de los propágulos presentes en el suelo y de la estimación de la colonización micorrízica en plantas trampa (Nehl *et al.*, 1999). Comúnmente se evalúa el número de esporas, sin embargo, no parece ser un indicador suficiente para medir el potencial de inóculo de un suelo, ya que existen especies que no producen esporas y, en ocasiones, cuando éstas están presentes se encuentran parasitadas y/o muertas, además, a través de su conteo no se determina el inicio de la colonización micorrízica, por lo tanto, no indican el potencial de inóculo real (Abbott y Robson, 1991).

Entre los métodos más utilizados para evaluar la cantidad de propágulos se encuentra el del número más probable de Porter (1979) (Apéndice 1) que consiste en estimar el número de propágulos infectivos de un suelo en particular, utilizando una serie de diluciones y valorando la presencia o ausencia de colonización en las raíces de la planta trampa en cada una de las diluciones; así, suelos con mayor potencial de inóculo presentarán una mayor incidencia de colonización aunque el suelo esté diluido en más de la mitad, mientras que un suelo con poco potencial de inóculo no mostrara evidencia de colonización aún desde diluciones bajas (Sieverding, 1991).

La disponibilidad y cantidad de los propágulos de HMA, así como su potencial de inóculo están influenciados por diversos factores, tales como las condiciones edáficas y microambientales (Pattinson y Mc Gee, 1997), los disturbios (Jasper *et al.*, 1989 y 1991; Pattinson *et al.*, 1999), la historia de uso del suelo (Boddington y Dodd, 2000; Menéndez *et al.*, 2001; Oehl *et al.*, 2003), la diversidad vegetal, así como la estacionalidad (Smith y Read, 1997; Allen *et al.*, 1998). En particular, es de esperarse que si la diversidad disminuye, además de la densidad de esporas y demás propágulos, también lo haga el porcentaje de colonización micorrízica, por lo que puede inferirse que el potencial de inóculo así como la efectividad varían según las condiciones físicas y prácticas de manejo del sitio.

En general, cuando se presenta algún tipo de disturbio natural o inducido, algunos propágulos suelen ser más sensibles que otros. Tanto las raíces colonizadas como las esporas son propágulos más resistentes al disturbio que los otros propágulos, en el primer caso el micelio se encuentra protegido dentro de la raíz y, a menos que la planta sea dañada, dicho micelio sobrevivirá; en el segundo caso, al ser estructuras de resistencia y tolerar condiciones de estrés, las esporas suelen ser la principal fuente de inóculo y la más efectiva para colonizar las raíces de las plantas en suelos que presentan algún tipo de disturbio; en contraste el micelio extrarradical, al ser muy sensible a un proceso de disturbio suele ser una fuente de colonización secundaria (Jasper *et al.*, 1989, 1991; Smith y Read, 1997; Pattinson *et al.*, 1999).

1.1.5 Factores que influyen en la estructura y potencial de inóculo de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares

La comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), en especial su composición, abundancia y potencial de inóculo, pueden verse influenciados por varios factores, tales como las variaciones estacionales, la humedad, compactación y calidad del suelo, y la comunidad vegetal que la sostiene, entre otros (Molino y Amarantus, 1990).

1.1.5.1 Factores abióticos

Un factor que puede modificar la comunidad de HMA es la luz. En invernadero, la formación de la asociación micorrízica disminuye cuando la incidencia de luz es menor (Tester *et al.*, 1986), esto debido a que bajo esas condiciones de luz la planta crece menos y no tiene los suficientes carbohidratos para mantener al hongo.

En cuanto a la temperatura, diversos autores indican que las especies fúngicas evolucionan y se desarrollan en diferentes ambientes, de tal forma que las especies de HMA se encuentran distribuidas según su capacidad de adaptación. Por lo que, las especies de HMA que se encuentran adaptadas a ambientes fríos, un disparo en la temperatura promoverá su germinación, mientras que si se han desarrollado en ambientes cálidos, un descenso o aumento drástico previo a la época de secas la inhibirá (Koske, 1987; Pawloska y Charvat, 2002).

Monz *et al.* (1994) reportaron que un incremento de 4°C en la temperatura disminuye la colonización micorrízica en *Pascopyrum smithii* pero al compararla con *Bouteloua gracilis* no encontraron ningún cambio. Asimismo, Gavito *et al.* (2005) indicaron que el crecimiento de algunas especies de HMA se encuentra reducido y limitado a temperaturas menores a los 20°C, debido a que el crecimiento de muchas plantas en ambientes templados y fríos también es limitado y, como respuesta, la transferencia de C al hongo resulta ser reducida. Es evidente que existe un efecto directo de la temperatura sobre los HMA y que éstos responden de manera diferente a los cambios en esta variable, sin embargo, Staddon *et al.* (2002) indicaron la necesidad de estudiar con más detalle su influencia en los HMA tomando en cuenta la respuesta del hospedero, así como otros factores que induzcan cambios en la comunidad vegetal y fúngica.

Las diferencias en pH y en la concentración de nutrientes también son otros factores importantes que influyen en el potencial de inóculo y en la estructura de la comunidad de HMA. En respuesta al pH la composición de HMA puede variar, por ejemplo, se ha reportado la preferencia de especies de los géneros *Gigaspora*, *Acaulospora* y *Glomus* en suelos ácidos que comúnmente presentan alta toxicidad por elementos como el aluminio (Clark, 1997; Sano *et al.*, 2002). En cuanto a los nutrientes P, C y N, que son esenciales para que las plantas lleven a cabo funciones como la síntesis de aminoácidos, ATP y azúcares, su disponibilidad en el suelo puede afectar a la comunidad de plantas y, por tanto, modificar

los niveles de colonización micorrízica; de esta forma, si el suelo es deficiente en estos nutrientes o no se encuentran disponibles para las plantas, la asociación micorrízica se incrementará y mejorará la absorción de nutrientes para las plantas (Gavito y Varela, 1993; Brundett *et al.*, 1996), en caso contrario, es probable que la alta disponibilidad de nutrientes en el suelo reprima la colonización fúngica debido a que la planta puede tomar directamente del suelo los nutrientes sin tener que asociarse al hongo.

La distribución y abundancia de los HMA también se relaciona con cambios en las propiedades del suelo a diferentes profundidades, es decir, la concentración de raíces y propágulos, así como los niveles de colonización disminuyen conforme aumenta la profundidad del suelo debido a que la compactación del suelo es mayor, la capacidad de intercambio catiónico se incrementa y las concentraciones de P, C y O₂ disminuyen, impidiendo la supervivencia de los HMA, por lo que es de esperar que la mayor concentración de propágulos y colonización micorrízica se encuentren de los 0 a los 25cm de profundidad, donde las condiciones del suelo son favorables para su desarrollo (Nadian *et al.*, 1996; Nehl *et al.*, 1999; Diagne *et al.*, 2001; Oehl *et al.*, 2005).

Los disturbios generados naturalmente o por el hombre, pueden también ser factores importantes que modifiquen la comunidad de HMA. Las erupciones volcánicas son catástrofes naturales que eliminan los propágulos de HMA debido a las altas temperaturas producidas durante la erupción, pero, posteriormente, durante las primeras etapas de sucesión vegetal comienzan a invadir el sustrato volcánico solidificado y se inicia la colonización micorrízica; de hecho, estudios recientes señalan que las primeras especies sucesionales pueden ser altamente micotróficas debido a que en las primeras etapas de la sucesión los suelos son pobres en nutrientes y la asociación micorrízica representa una ventaja para la captura de éstos, mientras que las especies que se encuentran en las últimas etapas sucesionales tienen mayor disponibilidad de nutrientes y, por lo tanto, son menos micotróficas (Gemma

y Koske, 1990; Zangaro *et al.*, 2000).

El fuego puede ser otro factor de disturbio importante que afecta a los HMA, se ha reportado una disminución del número de propágulos viables y de infectividad por HMA en sitios donde ocurrió un incendio con respecto a sitios intactos, ya que con la eliminación de la cobertura vegetal el suelo se erosiona rápidamente y con ello los propágulos más sensibles al disturbio como el micelio y raíces tienden a disminuir (Rashid *et al.*, 1997; Pattinson *et al.*, 1999).

1.1.5.2 Factores bióticos

Las variaciones fenológicas de las plantas, independientemente del sistema de estudio, influyen sobre la comunidad de HMA del suelo. La actividad micorrízica está influenciada por la fenología de la planta hospedera; durante la época de lluvias, se puede presentar un mayor porcentaje de colonización así como un menor número de esporas (Allen *et al.*, 1998). En particular, en las selvas secas con una precipitación muy marcada durante el verano, el número de propágulos presentes en el suelo es afectado, específicamente la cantidad de esporas es menor debido a que germinan más en esta época formando nuevas asociaciones con las plantas, por lo tanto, durante esta época se registra la mayor infección y la menor durante secas (Allen *et al.*, 1998); por otro lado, el número de esporas es mayor en secas ya que funcionan como estructuras de resistencia ante el déficit de agua. En los sistemas tropicales húmedos las variaciones estacionales también influyen en la dinámica de los HMA; en secas la producción de esporas es alta y la colonización micorrízica baja, mientras que en época de lluvias la colonización micorrízica suele ser mayor debido a que la germinación de esporas se ve favorecida por la disponibilidad de agua, sin embargo su abundancia es menor. Estos hechos implican que la precipitación sea un factor determinante en la asociación micorrízica (Brundett y Abbott, 1994; Guadarrama y Álvarez-Sánchez, 1999).

Otro disturbio natural es la actividad depredadora de la fauna del suelo. Existen estudios que sugieren que el aumento o disminución de los propágulos en el suelo, así como el recambio de especies de HMA entre sitios, se debe a que diversos animales trasladan los propágulos de un lugar a otro en sus tractos digestivos o en sus extremidades y contribuyen a aumentar la diversidad de HMA en sitios con características microambientales diferentes (Janos 1980b; Ramírez-Gerardo *et al.*, 1997).

Generalmente, entre los disturbios más importantes se encuentra la eliminación de cobertura vegetal nativa para la creación de campos de cultivo o prácticas agropecuarias. Con ello, la pérdida de suelo también se incrementa (Wiseman y Wells, 2005) y como resultado el número de propágulos de HMA presentes en el suelo tiende a disminuir, así como su potencial de inóculo, debido a la remoción de plantas hospederas y a la ruptura del micelio extrarradical de HMA (Jasper *et al.*, 1989, 1991; Abbott y Robson, 1991; Boerner *et al.*, 1996; Gould *et al.*, 1996; Requena *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1998; Richter *et al.*, 2002; Oehl *et al.*, 2003), que es uno de los propágulos más sensibles al disturbio (Sylvia y Jarstfer, 1992).

1.1.6 La comunidad de HMA de la región de los Tuxtlas

En los sistemas tropicales, la comunidad vegetal está sometida a disturbios tales como la deforestación que, particularmente para la zona de Los Tuxtlas, es un proceso muy común que se ha dado en los últimos 40 años con mayor intensidad, debido a la introducción de prácticas como la ganadería y la agricultura (Guevara *et al.*, 2004). Este proceso ha generado la reducción del continuo de selva en un mosaico de fragmentos de diferentes tamaños y formas, aislados unos de otros por una matriz de vegetación diferente a la original (Mendoza *et al.*, 2005). Diversos autores indican que las principales consecuencias de este proceso implican cambios en la diversidad y abundancia de especies animales y vegetales (Scariot, 1999; Laurance *et al.*, 2000; Hill y Curran, 2003; Cagnolo *et al.*, 2006; Laurance *et al.*, 2006; Arroyo-Rodríguez *et al.*, 2007), al reducir su área de distribución, modificando el tamaño de

sus poblaciones y aumentando las tasas de extinción local y de migración (Simberloff y Abele, 1982; Wilcove *et al.*, 1986, Saunders *et al.*, 1991).

De manera general, los fragmentos sufren una disminución de la riqueza de especies vegetales y animales a medida que la reducción en el continuo de selva es mayor y los fragmentos con menor área frecuentemente poseen menor riqueza de especies nativas comparados con aquellos que presentan un área mayor (Santos y Tellería, 2006), esto debido a que un fragmento más pequeño tiene un mayor efecto de borde que uno grande. El efecto de borde consiste en una serie de cambios microambientales alrededor del fragmento a los que ciertas especies, que se encuentran hacia el interior del fragmento no pueden responder y adaptarse y, por lo tanto, sus tasas de extinción aumentan (Turner, 1996; Santos y Tellería, 2006).

Dada la relación planta-HMA, es de esperarse que si la comunidad vegetal es afectada por la fragmentación, ésta afecte también a la comunidad de HMA, tanto en su estructura como en su potencial de inóculo. De tal manera que el tamaño puede estar relacionado con la capacidad que tiene un fragmento para sostener un número de especies vegetales determinado y los HMA que están asociados a ellas. Sin embargo, poco se sabe sobre la comunidad de HMA en los fragmentos y aún menos sobre si el tamaño del fragmento tiene alguna influencia sobre éstos, ya que son casi nulos los estudios que abordan este tema (Mangan *et al.*, 2004). Por lo tanto, el presente trabajo pretende describir el potencial de inóculo, y si éste está relacionado con la diversidad, riqueza y composición de la comunidad de HMA.

Con base en lo anterior, se han planteado en este estudio las siguientes preguntas ¿el potencial de inóculo de los HMA está relacionado con el tamaño del fragmento?, ¿la diversidad y composición de morfoespecies de HMA que se encuentran en fragmentos de selva chicos y grandes está relacionada

con el potencial de inóculo de dichos fragmentos?

El presente trabajo forma parte de un proyecto denominado “Restauración ecológica en la zona intertropical: el uso de hongos micorrizógenos arbusculares” apoyado por SEMARNAT-CONACyT-2002-c01-668, cuyo objetivo general fue conocer la dinámica de los hongos micorrizógenos arbusculares en comunidades naturales de la selva alta perennifolia de Los Tuxtlas, Veracruz, y su efecto en el crecimiento y supervivencia de especies vegetales con el objeto de potenciar la restauración ecológica de ambientes deteriorados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios sobre potencial de inóculo en las selvas

En las selvas tropicales la dinámica de los HMA se encuentra en función de distintos factores como la disponibilidad de agua, la luz, las condiciones edáficas y algunas prácticas agropecuarias. Algunos estudios reportan que durante la época de lluvias el potencial de colonización tiende a ser alto, pero la esporulación es poco frecuente y la cantidad de propágulos baja, en comparación con la de secas (Janos, 1992; Fischer *et al.*, 1994). Adicionalmente, las prácticas agropecuarias y otros disturbios recurrentes como la apertura de claros dentro de la selva, originados por la caída de árboles, pueden reducir el potencial de inóculo de un suelo (Janos, 1980b).

Desafortunadamente, son pocos los estudios sobre HMA en las selvas tropicales, la mayoría de los cuales analizan la diversidad y abundancia de esporas de HMA en diferentes ambientes y en relación con el tipo de disturbio (Jasper *et al.*, 1991; Ramírez- Gerardo *et al.*, 1997; Guadarrama y Álvarez-Sánchez, 1999), así como los efectos de la asociación sobre la planta hospedera (Allen *et al.*, 2003; Guadarrama *et al.*, 2004b; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2007). No existen estudios que analicen el potencial de inóculo de los HMA en este ecosistema.

En la selva tropical de Panamá, Kiers *et al.* (2000) analizaron el efecto del inóculo proveniente de la selva intacta sobre el crecimiento y supervivencia de especies nativas. Realizaron tres experimentos haciendo crecer seis especies de árboles nativos de la selva a partir de semillas, con diferentes historias de vida, pioneras *Luehea semannii* y *Ochroma pyramidale* y persistentes, *Anacardium excelsum*, *Dipterix panamensis*, *Licania platypus* y *Theobroma cacao*. Todas fueron inoculadas con fragmentos de raíces de individuos adultos de las mismas especies, asimismo, se tuvieron individuos sin ningún tipo de inóculo como control. En el primer experimento, semillas de *A. excelsum* y *D. panamensis* fueron inoculadas con inóculo de cada uno de ellos y observaron la

presencia de las principales estructuras fúngicas. Posteriormente realizaron el bioensayo del número más probable para obtener el número de propágulos infectivos y comparar el potencial de inóculo de los diferentes inóculos; reportaron valores de 780 a 23 054 propágulos infectivos para el inóculo de *A. excelsum* y de 2 305 a 4 922 propágulos infectivos para el de *D. panamensis*. De igual manera, en el segundo experimento *L. semanii* y *O. pyramidale* fueron inoculadas para probar diferencias en colonización y supervivencia. En el tercer experimento se expusieron semillas de *T. cacao* y *L. platypus* a los seis inóculos con el fin de analizar el efecto de éstos sobre el crecimiento de las semillas. De manera general, reportaron dependencia de las semillas a la micorrización en los tres experimentos; de igual manera encontraron una mayor colonización por HMA cuando las raíces de las diferentes especies fueron expuestas a su mismo inóculo. Se obtuvieron diferentes patrones de crecimiento dependiendo de la fuente de inóculo de HMA. Sin embargo, en las seis especies, el mayor crecimiento no correspondió a su mismo inóculo y en el caso del primer experimento, el crecimiento de las semillas no estuvo relacionado con la cantidad de propágulos de los inóculos respectivos. De tal manera que el crecimiento y supervivencia de las seis especies de plantas respondieron de manera diferente según la procedencia del inóculo.

Zhang *et al.* (2004) analizaron la riqueza y abundancia de esporas de HMA en áreas de selva intacta y áreas deforestadas en la región suroeste de China. Reportaron 44 morfoespecies de los géneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophospora* y *Archaeospora*, 34 de las cuales fueron encontradas en ambos sitios, sin embargo la riqueza fue mayor en los sitios deforestados que en la selva, 5.3 ± 0.3 especies en 100 g de suelo seco y 4.1 ± 0.2 en 100 g de suelo seco, respectivamente. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en la abundancia de esporas, 284 ± 50 esporas en 100 g de suelo para la selva y 349 ± 37 esporas en 100 g de suelo para los sitios deforestados. Estos datos indican que el proceso de deforestación no afecta la composición y densidad de esporas de HMA, sino que incrementa la riqueza de especies de HMA significativamente, debido a que en estos sitios la cantidad de herbáceas es mayor

que en la selva y estas plantas hospederas suelen establecer una relación más estrecha con los HMA que con los árboles, además, algunas propiedades del suelo se ven alteradas, como la humedad que tiende a disminuir y la temperatura a incrementarse, bajo estas circunstancias estresantes la producción de esporas es mayor.

Lovelock y Ewel (2005) analizaron la relación entre la diversidad fúngica y vegetal en ambientes perturbados de la selva tropical en Costa Rica. El objetivo de este estudio fue evaluar si la diversidad de las especies vegetales hospederas afecta a la comunidad de HMA y si ésta tiene alguna relación con la asimilación de los recursos (P) por parte del hospedero y por tanto de la productividad del ecosistema. Para ello, se estudiaron muestras de suelo de parcelas previamente establecidas en una plantación de cacao abandonada, donde fueron establecidos monocultivos y policultivos de diferentes especies de árboles y se obtuvo la riqueza y abundancia de HMA. Además realizaron un análisis de correlación entre la diversidad de HMA y las variables de Productividad Primaria Neta (PPN) y la cantidad de fósforo lábil. Respecto a la diversidad de HMA se encontraron 16 morfoespecies de los géneros *Glomus*, *Acaulospora* y *Scutellospora* con un total de 3065 esporas viables. Se encontró un número promedio de esporas similar entre monocultivos y policultivos, de 25.3 ± 1.7 esporas en 50 g de suelo. Asimismo, la riqueza fue similar en ambas prácticas, 4.17 ± 0.22 en 50 g de suelo para policultivos y 4.00 ± 0.21 en 50 g de suelo en monocultivos. Sin embargo, esta mínima diferencia radica en la composición de especies vegetales de las parcelas, quienes determinaron la composición de la comunidad de HMA, por ejemplo, en el caso del policultivo, las especies de HMA más y menos abundantes fueron *A. spinosa* y *A. morrowiae*, con 47 y 23% del total del número de esporas presentes en cada sistema, en contraste, en el monocultivo la abundancia de estas especies es del 12 y 57% respectivamente, lo que indica que la abundancia de esporas de HMA también puede estar influenciada por la especie hospedera. Por otra parte, en los policultivos la PPN se incrementa conforme la diversidad de HMA aumenta, mientras que en los monocultivos la PPN es alta aún cuando la

diversidad es menor. Se indica que la alta diversidad de HMA reduce la competencia entre los hospederos, lo cual, permite que estos mejoren su productividad. En cuanto a la relación entre la diversidad de HMA y el P, no se encontraron diferencias significativas. Estos datos muestran una primera aproximación de la relación entre la diversidad vegetal y la de HMA y que ésta última está influyendo la PPN de la selva tropical de Panamá.

2.1.1 Estudios sobre potencial de inóculo en las selvas en México

En México, Allen *et al.* (1998) realizaron un estudio en la selva baja caducifolia de Chamela, Jalisco, durante diferentes épocas para determinar la actividad micorrízica en este ecosistema y en diferentes ambientes sometidos a perturbación; claros hacia el interior de la selva producto de la caída de los árboles y áreas que fueron convertidas en pastizales. Para ello, obtuvieron la diversidad de HMA, el número de esporas y el porcentaje de colonización micorrízica de la rizósfera en los diferentes sitios y en tres épocas del año, secas, lluvias e invierno. Tanto el porcentaje de colonización (85%) como la densidad de esporas (12 esporas/g de suelo) fueron altos durante la época de lluvias (julio) en comparación con las de las otras épocas. La abundancia de esporas dependió del suelo de procedencia; la mayor abundancia (28 g⁻¹ de suelo) se registró en suelos rojos y la menor en los amarillos (3-9 g⁻¹ de suelo); lo contrario sucedió con la riqueza, los suelos amarillos presentaron trece especies y los rojos sólo seis, del total de quince. Tanto el porcentaje de colonización como la densidad de esporas no fueron diferentes entre claros y el interior de la selva. En cuanto a los pastizales, los porcentajes de colonización variaron entre el 23 y 46%, mientras que la cantidad de esporas fue baja, de 1.5 a 2.8 g⁻¹ de suelo. Aún cuando la esporulación fue alta durante lluvias, una vez que llega la época de secas pocas esporas sobreviven y, por lo tanto, el potencial de inóculo tiende a ser bajo durante esta época. Sin embargo, se piensa que las raíces colonizadas pudieron contribuir a mantener el potencial de inóculo durante esta época y que las esporas podrían funcionar como estructuras dispersoras capaces de iniciar una nueva asociación micorrízica en sitios perturbados.

Recientemente, en la selva baja caducifolia de la región de Nizanda, Oaxaca, Guadarrama *et al.* (2008) evaluaron el potencial de inóculo de suelos con diferentes edades de abandono, utilizados previamente para la agricultura. Para ello, obtuvieron el porcentaje de colonización micorrízica, las densidades de los principales propágulos de HMA, esporas y micelio extrarradical para cada parcela y, por último, realizaron la técnica del número más probable para obtener la cantidad total de propágulos en el suelo de cada parcela. Los porcentajes de colonización total promedio van del 29.3% (± 5.3) en la parcela con 14 años de abandono a 69.3% (± 10.1) para la de 27 años. En cuanto a las esporas, menos del 50% fueron viables, con concentraciones promedio que van de 18.1 en 100 g de suelo (± 2.8) en la parcela con 7 años de abandono a 35.5 en 100 g de suelo (± 3.8) en la parcela con 10 años. Asimismo, sólo el 40% de la cantidad total promedio de micelio fue viable con longitudes de 2.96 m g⁻¹ de suelo seco (± 9.661) para la parcela con 25 años y de 8.57 m g⁻¹ de suelo seco (± 0.468) para la de 1 año. El menor número total de propágulos fue de 4 para la parcela de 27 años, mientras que el mayor fue de 421 para la de 18 años. Las cantidades de los diferentes propágulos no muestran una relación clara con la edad de abandono; las áreas con mayor edad de abandono, 25 y 27 años tienen las densidades más bajas de propágulos infectivos y micelio viable, sin embargo, se reportó el mayor porcentaje de colonización en la de 27 años; en cuanto a las parcelas con edad media de abandono, 10 y 18 años tuvieron la mayor cantidad de esporas y de propágulos infectivos, respectivamente, mientras que la de 14 presentó el menor porcentaje de colonización. En cuanto a las parcelas más jóvenes, la de 1 año tuvo la mayor cantidad de micelio viable y la de 7 la menor cantidad de esporas. Estos datos sugieren que en la región de Nizanda, Oaxaca, las prácticas agrícolas no influyen de manera negativa sobre el potencial de inóculo del suelo. Los cambios en el potencial de inóculo son atribuidos a otros factores como la luz, las condiciones edáficas, la compactación del suelo, así como la composición y distribución de las especies de HMA.

2.2 Estructura de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares en fragmentos de selva de diferente tamaño

El impacto de la fragmentación sobre la comunidad de HMA ha sido poco estudiado y menos aún sobre la calidad de su inóculo en la selva alta perennifolia. El único estudio fue realizado en Panamá por Mangan *et al.* (2004), ellos evaluaron la importancia e influencia de la escala espacial y el tamaño de los fragmentos, así como la distancia que los separa entre sí sobre la composición de la comunidad de HMA. Realizaron un muestreo de esporas de HMA de suelo proveniente del bosque hacia el interior del continente y en islas que se encontraban en los alrededores del Lago Gatun, en dos tamaños, chico y mediano, con el fin de comparar la diversidad y riqueza de HMA. En este estudio observaron que los sitios dentro del continente fueron similares entre sí, en términos de la identidad de las esporas y su abundancia, aún cuando estuvieran alejados unos de otros a más de 1 km; sucedió lo mismo entre las islas, sin importar que tuvieran diferentes tamaños y la separación geográfica entre ellas. Sin embargo, al comparar la composición entre las zonas del continente e isla, se registraron abundancias diferentes dependiendo del sitio y de la especie de HMA, *Glomus "tsh"* y *G. clavisporum* tuvieron un mayor número de esporas en los sitios continentales, mientras que en los insulares, *Acaulospora mellea* y *Glomus "brown"* fueron las más abundantes. Este hecho puede ser indicador de que la funcionalidad de las especies de HMA puede variar en términos de los fragmentos grandes (continentales) y los chicos (islas), sobre todo si se considera que el potencial de inóculo depende del número de esporas, además de la especie de que se trate.

2.2.1 Estructura de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares en la región de Los Tuxtlas

En la selva alta perennifolia de Los Tuxtlas, no se han llevado a cabo estudios sobre el impacto de la fragmentación en la comunidad de HMA, las pocas referencias al respecto sólo se han basado en análisis sobre las formas, tamaños, distribución (Mendoza *et al.*, 2005), microclima, estructura de la vegetación y composición florística de los fragmentos y sus bordes (Williams-Linera *et al.*, 1998; Arroyo-Rodríguez y Mandujano, 2006; Arroyo-Rodríguez *et al.*, 2007) y apuntan a que la fragmentación de la selva está afectando negativamente a la comunidad de plantas nativas. En general, estos estudios sugirieron la importancia de conservar aquellos fragmentos más grandes y continuos de selva ya que tienen mayor diversidad y más especies vegetales nativas.

En el caso de los HMA, no existen estudios que indiquen que el proceso de fragmentación que es común en esta zona, influya sobre su estructura y por consiguiente, si el tamaño del área de estos fragmentos tiene alguna implicación en la calidad del inóculo. Los estudios realizados hace algunos años en la selva alta perennifolia se basaron en el análisis de la composición de especies de HMA, a partir de sus principales propágulos, las esporas. La información generada proviene de sitios como fragmentos de selva intacta o madura, claros, pastizales, así como en el área de borde (área límite entre la selva y pastizal, con diferentes condiciones microambientales) y bajo árboles remanentes que se encuentran dentro de los potreros. Entre los resultados generados se reportaron 18 morfoespecies de los géneros *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora* y *Scutellospora*; la mayor riqueza de especies se encontró en los fragmentos de selva durante la época de secas comparada con la de lluvias, asimismo, el número de esporas también se incrementó durante secas a más de 200 esporas en 100 g de suelo y menos de 50 en 100g de suelo durante lluvias. En el caso de la producción de raíces, sucede lo contrario, ésta es mayor en lluvias (0.1 g m⁻²) y menor en secas (0.01 g m⁻²). Estos resultados indican que en los fragmentos de selva, la estacionalidad puede determinar una mayor riqueza de especies y un alto número de esporas

durante secas, pero menor producción de raíces. Sin embargo, la mayor abundancia de esporas se encontró en pastizales que son sitios con mayor perturbación, a la que los HMA tienen mayor tolerancia debido a la dominancia de pastos que promueve una afinidad más estrecha con éstos (Guadarrama y Álvarez-Sánchez, 1999).

También se analizó la colonización de raíces de la palma *Astrocaryum mexicanum* por HMA en claros de la selva y en dosel cerrado, durante lluvias y secas. La mayor colonización se reportó durante lluvias en claros y dosel, con mayor presencia de vesículas en claros y más arbusculos en dosel. Algunos factores que influyeron en estos resultados fueron la luz, la disponibilidad de P y la competencia por los nutrientes, N y P. En los claros la incidencia de luz fue mayor dado el disturbio, mientras que la competencia por los recursos fue menor, por lo que se registró mayor porcentaje de vesículas como estructura de almacenamiento de nutrientes indispensables para la supervivencia de la palma; en el dosel tanto la incidencia de luz como la disponibilidad de los recursos fue menor, por lo que la competencia por éstos es mayor entre las especies vegetales así como para la palma, de tal manera que la colonización por los HMA puede incrementar la absorción de nutrientes y disminuir la competencia (Núñez-Castillo y Álvarez-Sánchez, 2003).

En pastizales, los árboles remanentes juegan un papel importante como sitios que pueden mantener la riqueza y abundancia de HMA, debido a que el microambiente e interacciones bióticas bajo ellos son adecuadas para el desarrollo de los HMA, sin embargo, existen otros factores como la competencia, la precipitación y las condiciones edáficas que pueden influir en la composición de la comunidad de HMA, así como en la colonización de las especies vegetales que están bajo los árboles remanentes (Ramírez-Gerardo *et al.*, 1997). En general, se observó una mayor colonización y una menor producción de esporas durante la época de secas debido a la disminución de recursos en el suelo, principalmente de fósforo y agua, por lo que es probable que los árboles remanentes no influyan

negativamente sobre el potencial de inóculo de estos hongos y, por tanto, la comunidad de HMA que se encuentra bajo ellos puede tener implicaciones importantes en la dinámica sucesional de la vegetación. (Ramírez-Gerardo *et al.*, 1997).

Por otro lado, existen estudios en esta región en los que se ha encontrado que las plántulas nativas de la selva, tanto pioneras como persistentes responden de manera diferente ante la inoculación con HMA dependiendo de sus historias de vida, así como de otros factores que son determinantes para su supervivencia como la luz y disponibilidad de nutrientes, principalmente fósforo, como se ha estado señalado. Asimismo, se ha determinado que la asociación micorrízica con las plantas nativas tiene un efecto en la regeneración de la selva, que puede ser positivo o negativo, dependiendo de la historia de vida de la especie vegetal (Sánchez-Gallen, 1999; Sánchez-Gallen y Guadarrama, 2000; Sánchez-Gallen y Guadarrama, 2003; Guadarrama *et al.*, 2004 a y b; Peña-Becerril, 2005; Quiroz-Ayala, 2006).

Recientemente, se llevó a cabo un estudio en esta región, apoyado por la Global Environmental Facility (Varela *et al.*, 2008). El propósito de este trabajo fue determinar si los diferentes cambios en el uso de suelo a los que ha sido sometida la selva alta perennifolia de Los Tuxtlas afectan la diversidad de HMA. Para ello, seleccionaron tres sitios (ventanas) de la reserva de la biosfera de Los Tuxtlas de acuerdo al grado de disturbio en términos de su cobertura vegetal. El primero presentó 75% de cobertura de selva alta perennifolia, el segundo 50% de bosque mesófilo de montaña y la última ventana 25% de selva alta. Se tomaron muestras de suelo correspondientes a cuatro usos de suelo: selva nativa, agroforestal, pastizales y milpa. Las esporas de HMA fueron separadas, identificadas y cuantificadas. En total obtuvieron 59 especies de HMA de los géneros *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora* y *Gigaspora*. Se encontraron 40 especies en la primera ventana, 54 en la segunda y 45 en la tercera. Respecto a los usos de suelo, la selva presentó 43 especies, el agroforestal 42, el pastizal 44 y la milpa 50. Estos resultados sugieren una alta diversidad de HMA en la región de Los Tuxtlas e

indican que el cambio en los usos de suelo afecta la abundancia y riqueza de estos hongos. Tanto la selva como el bosque fueron los sitios con menos esporas, mientras que la milpa y los pastizales tuvieron el mayor número de esporas, lo cual atribuyen a que en estos últimos sitios las condiciones microambientales son más estresantes, la alta intensidad de luz y las elevadas temperaturas propician una mayor esporulación, mientras que en los sitios con mayor cobertura vegetal como la selva y el bosque, las condiciones microambientales suelen ser más estables y, por lo tanto, los HMA tienden a esporular menos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de colonización del inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares en fragmentos de diferente tamaño de vegetación de la selva alta perennifolia de Los Tuxtlas, Veracruz y establecer su relación con la estructura de la comunidad de HMA respectiva.

3.2 Objetivos particulares

- a) Describir la relación entre el potencial de inóculo y la diversidad, riqueza y composición de HMA en fragmentos chicos (<10 ha) y grandes (<100 ha).
- b) Estimar el porcentaje de colonización micorrízica en fragmentos de selva chicos y grandes.
- c) Estimar el número de propágulos infectivos para cada uno de los fragmentos.

4. HIPÓTESIS

Se espera que los fragmentos de menor área al presentar un mayor efecto de borde y menor cobertura vegetal, decrezcan en riqueza, diversidad y número de propágulos, comparados con los fragmentos de mayor área y, por lo tanto, su potencial de inóculo será, también, menor.

5. MÉTODOS

5.1 Área de estudio

La Reserva de la Biosfera “Los Tuxtlas”, se encuentra al SE del estado de Veracruz, entre los 18°05’ y 18°45’ de latitud norte y los 94°30’ y 94°35’ de longitud oeste. Cuenta con un área de 155 122 hectáreas y tiene una altitud máxima de 1780 msnm.; a altitudes menores a los 700 m la vegetación predominante es una selva alta perennifolia (Castillo-Campos y Laborde, 2004) (Figura 2). Su configuración espacial consiste en numerosos fragmentos de forma irregular y de diferentes tamaños (desde <1.0 ha hasta >100 ha) (Mendoza *et al.*, 2005), rodeados por una matriz compuesta de pastizales y campos de cultivo ocasionada por la acelerada deforestación producida entre 1970 y 1990 (Guevara *et al.*, 2004).

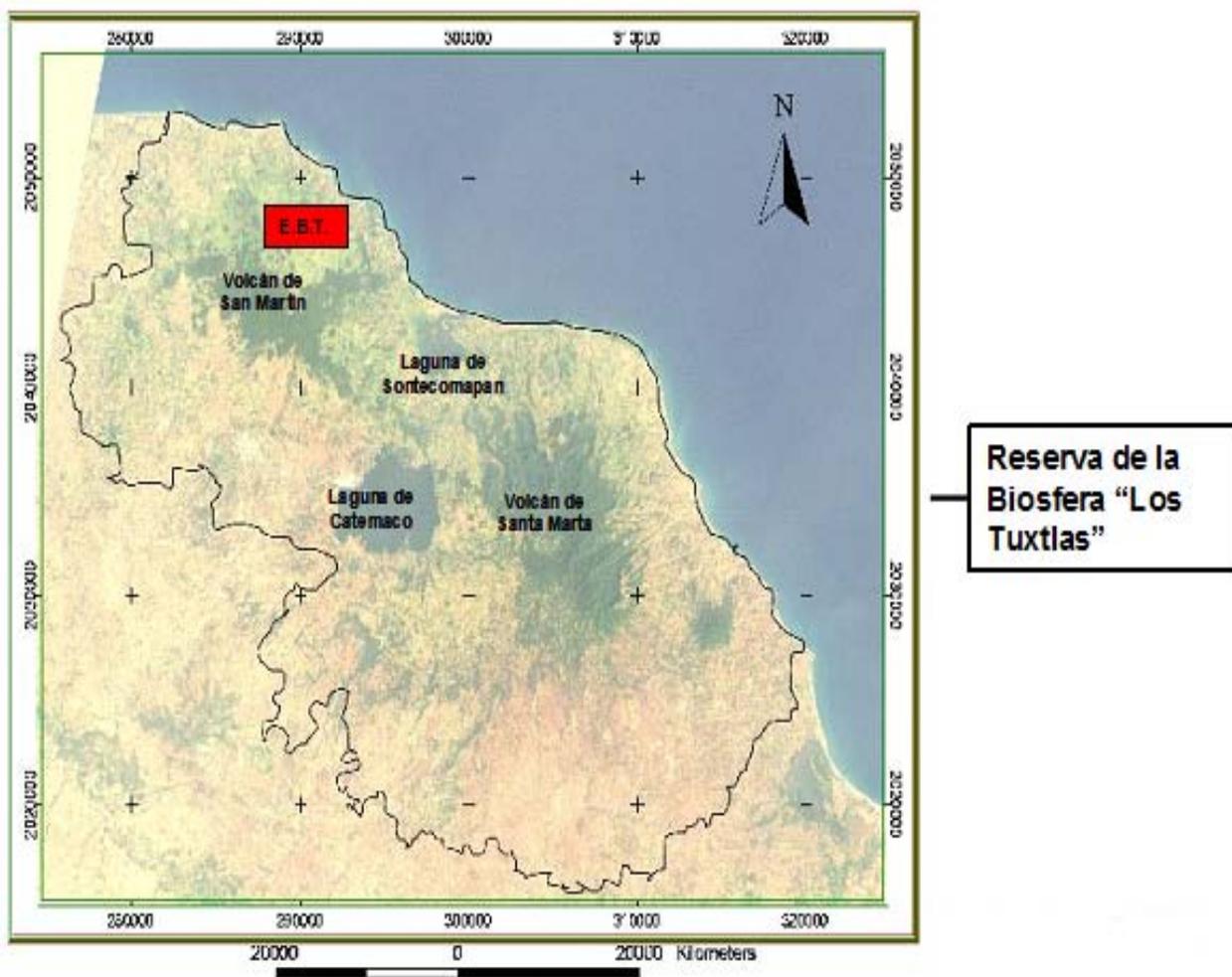


Figura 2. Localización de la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas en el estado de Veracruz. Imagen satelital tomada de García *et al.* (2005).

5.1.1 Clima

Para la región de Los Tuxtlas se reporta un clima de tipo cálido húmedo Af (m) con lluvias en verano, con una precipitación total promedio anual de 4 700 mm (Soto y Gama, 1997). Durante el periodo de secas que va de marzo a mayo, la precipitación total promedio al mes es de 100 mm, mientras que en la época de lluvias, que abarca de junio a octubre, es de 486 mm mensual (Lot-Helgueras, 1976). La temperatura media anual es de 24.3° C, con una máxima de 32.18 y una mínima de 16.4° C, con una oscilación media de 6° C (Soto y Gama, 1997). Entre los meses de noviembre y febrero, la zona es afectada por “nortes”, vientos provenientes del Golfo de México, desde el norte de Estados Unidos y sur de Canadá, con velocidades de 80-100 km/h, acompañados del aumento de la precipitación y de descensos rápidos en la temperatura (Soto y Gama, 1997).

5.1.2 Suelo

Los suelos de la región son producto de la alteración de materiales volcánicos expulsados por los volcanes de San Martín Pajapan, San Martín Tuxtla y el de Santa Marta desde hace alrededor de 1000 años (Nelson y González-Caver, 1992) y que muestran horizontes pocos desarrollados y varían en el contenido de materia orgánica (Chizon, 1984). Las condiciones ecogeográficas de la zona han dado origen a una diversidad importante de suelos, entre ellos se encuentran luvisoles, acrisoles, andosoles, feozems y vertisoles (Campos, 2004).

Predominan los suelos arcillosos hacia la parte sur y suroeste del volcán de Santa Marta que corresponde a la zona geológicamente más antigua; hacia la vertiente norte y noroeste, que es más húmeda, los suelos presentan una textura franco arcillo-limosa y franco-limosa. Los suelos que tienen influencia del volcán San Martín presentan una textura franco arcillo arenosa, franco arcillosa y franca, que corresponden a la zona geológica más reciente (Campos, 2004). Los suelos de la región son de colores rojo, rojo amarillento, pardo, pardo oscuro, pardo amarillento que es el más común y pardo

grisáceo.

Son suelos ácidos (pH 6.1-6.5) con altos contenidos de materia orgánica, nitrógeno y cationes intercambiables, sodio y potasio (Flores-Delgadillo *et al.*, 1999; Somer-Cervantes *et al.*, 2003). Hughes *et al.* (1999) reportaron para los suelos de la región de Los Tuxtlas que el contenido de P se encuentra en el intervalo de 5 a 140%, con concentraciones de aproximadamente 107 Kg ha⁻¹, producto de la gran cantidad de materia orgánica contenida en el suelo; en cuanto a la concentración de C en el suelo, se reportan de 1.3 a 6.2%, a profundidades que van desde los 0 a los 100 cm para sitios nativos. Campos (2004), indicó un porcentaje del 4 al 6% de carbono orgánico correspondiente a los sitios nativos.

Respecto al contenido de N en el suelo, las concentraciones van de 0.1% en suelos profundos a 0.6% en los horizontes superficiales. La relación C/N es de 10:6, igual en todos los sitios y a la misma profundidad (Hughes *et al.*, 1999). Hughes *et al.* (1999) indicaron que estos valores son muy altos comparados con los reportados en otros estudios para zonas tropicales (Sánchez, 1989) y que esto se debe a las propiedades del suelo anteriormente mencionadas y al pH que va de neutro a ácido, al relativamente alto contenido de arcillas y a la alta capacidad de intercambio catiónico. Por otro lado, los suelos más fértiles se encuentran en los alrededores del volcán de San Martín Tuxtla, sin embargo, en la mayoría de ellos la vegetación original ha sido removida para convertirlos en campos de cultivos y potreros, por lo que presentan problemas de compactación y erosión causados principalmente por la ganadería (Campos, 2004).

5.1.3 Vegetación

En la Reserva de la Biósfera de Los Tuxtlas se distinguen nueve tipos de vegetación: selva alta perennifolia, selva mediana perennifolia, selva baja perennifolia inundada (*sensu* Rzedowski, 1978), bosque mesófilo de montaña, bosque de pino, bosque de encino, sabana, manglar y dunas costeras (Castillo-Campos y Laborde, 2004). Sin embargo, el tipo de vegetación predominante es la selva alta perennifolia (Miranda y Hernández-X., 1963), que se encuentra distribuida en fragmentos de diferente tamaño desde el nivel del mar hasta los 700 m de altitud.

Su dosel se caracteriza por ser denso y cerrado con alturas de más de 30 m, la mayoría de los árboles tienen contrafuertes amplios. Entre las especies que destacan se encuentran: *Nectandra ambigens*, *Ocotea uxpanapana*, *Brosimum alicastum*, *Poulsenia armata*, *Ficus yoponensis*, *Bursera simaruba* y *Omphalea oleifera*. Bajo el dosel crecen especies arbóreas de menos de 20 m de altura, como son *Pseudolmedia oxyphyllaria*, *Pleuranthodendron lindenii*, *Pimenta dioica*, *Rheedia edulis* e *Inga pavoniana*, por mencionar algunas (Castillo-Campos y Laborde, 2004). El sotobosque en su mayoría está representado por palmas como *Astrocaryum mexicanum*, *Chamaedorea tepejilote* y *Bactris baculifera* (Castillo-Campos y Laborde, 2004). Otras formas son las lianas (bejucos), epífitas y hemiepífitas. Algunas especies que prosperan en claros formados por la caída de algún árbol son: *Cecropia obtusifolia*, *Heliocarpus appendiculatus*, *Myriocarpa longipes* y *Urera caracasana* (Castillo-Campos y Laborde, 2004).

Esta gran diversidad vegetal de la selva ha sido reemplazada gradualmente por la vegetación de los potreros y la de las zonas agrícolas, como el maíz, el café y otros cultivos (Castillo-Campos y Laborde, 2004).

5.1.4 Sitios de colecta

Se eligieron tres fragmentos chicos y dos grandes de selva alta perennifolia en función de las posibilidades de acceso y trabajo. Éstos se localizan dentro de la Reserva hacia el noreste de Catemaco, con altitudes que van desde los 100 hasta los 1100 msnm (Geissert, 2004) y representan una superficie total de 866 hectáreas (Figura 3). Sus principales características se muestran en el cuadro 1. Cabe destacar que en el fragmento más grande se encuentra ubicada la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, manejada por el Instituto de Biología de la misma institución, que desde 1967 se encuentra bajo la protección de la Universidad Nacional Autónoma de México y gran parte de su terreno nunca ha sido manejado ni talado.

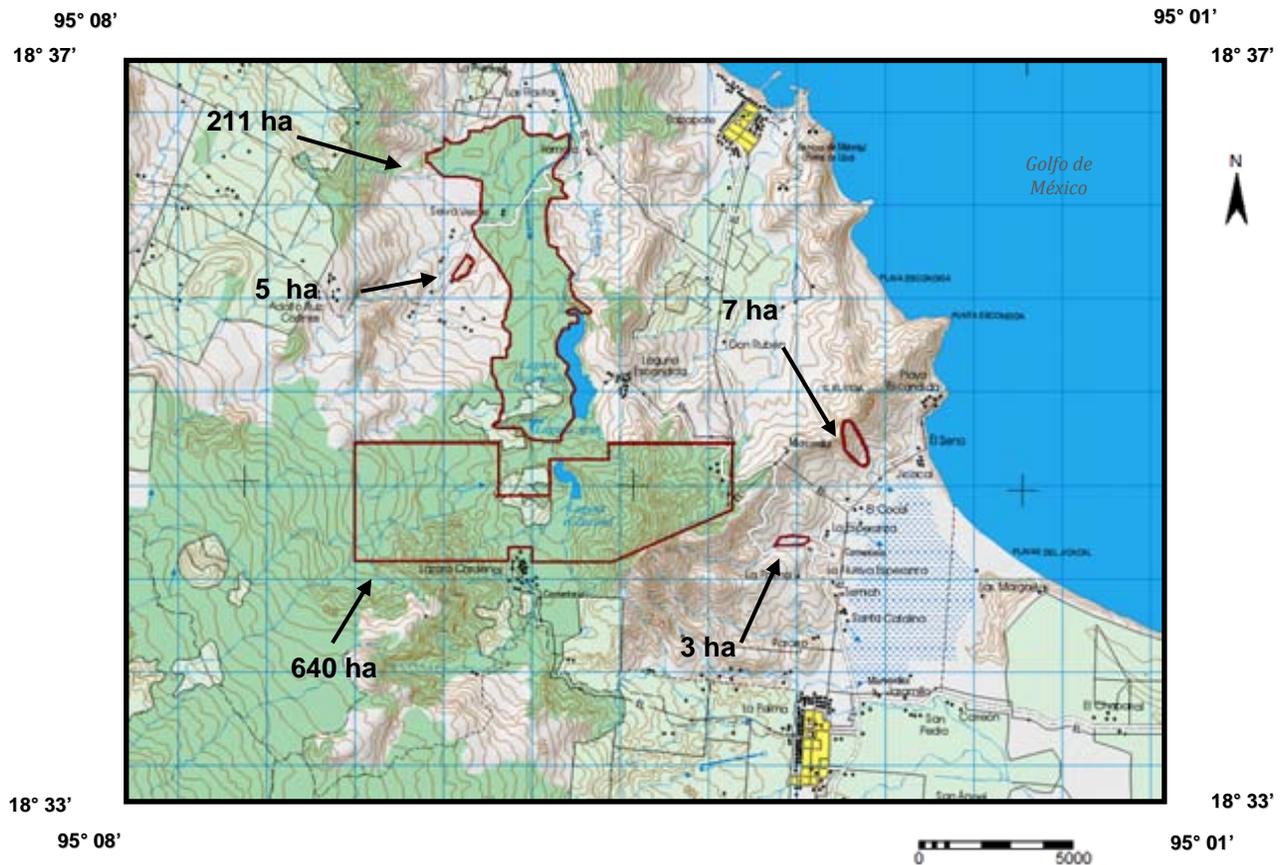


Figura 3. Ubicación de los fragmentos de estudio dentro del área de la Reserva. (Modificado de la Carta topográfica de INEGI, clave e15 a63; La Nueva Victoria escala 1: 50 000).

Cuadro 1. Caracterización de los sitios de colecta (Sánchez-Gallen *et al.* en prep.)

Superficie de los fragmentos (ha)	Localización		Edad de aislamiento (años)	Riqueza vegetal		Suelo	
	Chicos	Latitud norte		Longitud oeste	No. de especies	Especies más abundantes	pH
3	18°34'30.28" y 18°34'40.71"	95°04'1.69" y 95°03'55.91"	20	62	<i>Poulsenia armata</i> , <i>Dendropanax arboreus</i> y <i>Psychotria chiapensis</i>	5.9 (± 0.07)	5 (± 1.29)
5	18°35'12.44" y 18°35'13.71"	95°03' 36.31" y 95°03'32.92"	20	51	<i>Piper sanctum</i> , <i>Myriocarpa longipes</i> y <i>Omphalea oleifera</i>	5.8 (± 0.05)	7 (± 1.23)
7	18°30'21.03" y 18°36'12.37"	95°06'42.09" y 95°06'1.13"	20	57	<i>Trophis mexicana</i> , <i>Dendropanax arboreus</i> y <i>Omphalea oleifera</i>	6.1 (± 0.07)	11 (± 2.26)
Grandes							
211	18°35'54.34" y 18°36'8.38"	95°05'41.54" y 95°05'30.52"	20	114	<i>Astrocaryum mexicanum</i> , <i>Trophis mexicana</i> y <i>Pseudolmedia oxyphyllaria</i>	6.2 (± 0.10)	15 (± 2.74)
640	18°34'46.56" y 18°35'14.28"	95°07'06.43" y 95°04'31.14"	20	117	<i>Astrocaryum mexicanum</i> , <i>Chamaedorea alternans</i> y <i>Brosimum alicastrum</i> .	5.8 (± 0.03)	7 (±1.28)

5.2 Trabajo de campo

Se realizaron dos muestreos, el primero de ellos en la época de secas, durante el mes de marzo de 2005 ya que durante esta época se ha observado que esporula una mayor proporción de especies de HMA en comparación con la de lluvias (Janos, 1995; Ramírez-Gerardo *et al.*, 1997; Guadarrama y Álvarez Sánchez, 1999) y es posible extraer la mayor cantidad de morfoespecies y caracterizar, de manera más precisa, la estructura de la comunidad de HMA, en los fragmentos chicos y grandes seleccionados para el estudio. Para ello se colectó aleatoriamente suelo de 15 puntos en cada uno de los fragmentos teniendo un total de 45 puntos para los fragmentos chicos y 30 para los grandes. Las muestras fueron tomadas de los primeros 20 cm de profundidad, donde se encuentra la mayor parte de las raíces finas colonizadas (Sánchez-Gallen y Álvarez-Sánchez, 1996; Diagne *et al.*, 2001). Las muestras correspondientes a los fragmentos chicos y grandes por separado, fueron mezcladas y colocadas en bolsas de plástico. Una vez en el laboratorio fueron puestas a secar a temperatura ambiente, posteriormente se tamizaron con una malla de 5 mm para eliminar restos de raíces gruesas, materia orgánica y rocas, y se pesaron 15 muestras de 50 g de suelo seco de cada categoría de fragmento. Este suelo se utilizó para extraer esporas y así caracterizar la comunidad de HMA de fragmentos chicos y grandes, en su conjunto. De esta forma, se obtuvieron dos grupos de datos, aquéllos pertenecientes a los fragmentos chicos y los de los fragmentos grandes.

El segundo muestreo se realizó en lluvias, durante septiembre de 2006. En esta época, se puede evaluar el máximo potencial de inóculo de HMA dadas las condiciones de alta disponibilidad de agua en el suelo que promueven la germinación y desarrollo de las esporas y demás propágulos, así como su éxito de colonización (Guadarrama y Álvarez-Sánchez, 1999). Se extrajo aleatoriamente suelo de quince puntos de cada uno de los fragmentos, contando con un total de 18 muestras para los fragmentos chicos y 12 para los grandes. Cada una de las muestras fue colectada de los primeros 20 cm de profundidad y colocada dentro de bolsas de plástico; ya en el laboratorio se pusieron a secar a

temperatura ambiente. Este suelo se utilizó para estimar el número más probable de propágulos para cada uno de los fragmentos.

5.3 Invernadero

Las seis muestras obtenidas para cada fragmento correspondientes al mes de septiembre de 2006 se homogeneizaron y tamizaron con una malla de 2 mm de apertura, obteniendo una muestra compuesta de 5 kg de suelo seco para cada fragmento (en total cinco muestras compuestas, una por cada fragmento). Posteriormente, se extrajo una submuestra de 125 g de cada muestra compuesta para estimar el número de propágulos infectivos de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). Para ello, se aplicó el método del número más probable de acuerdo con Porter (1979), un bioensayo en invernadero que consiste en inocular sorgo (*Sorghum vulgare*) con una solución de suelo problema y que al cosechar permite estimar la infección micorrízica primaria (Apéndice 1). El suelo de cada fragmento fue diluido con arena estéril, de esta manera se tuvieron nueve diluciones más el control (dilución “0”) y cinco réplicas por cada una, es decir, 50 plantas por fragmento y 250 en total. Se realizó en enero de 2007, en el invernadero de la Facultad de Ciencias, UNAM, controlando las variables de temperatura y humedad durante siete semanas que duró el experimento. En promedio, la temperatura se mantuvo entre los 18 y 20° C, mientras que la humedad relativa fue de entre el 49 y 52%. Este bioensayo requiere de un periodo corto de tiempo para que se lleve a cabo la colonización primaria (Plenchette *et al.*, 1989), por lo que después de siete semanas, las raíces ubicadas en la zona del suelo diluido fueron cosechadas y lavadas con agua corriente y, por último, colocadas en celdas histológicas para su posterior tinción (Ramos-Zapata *et al.*, 2008).

5.4 Trabajo de laboratorio

5.4.1 Extracción, abundancia e identificación de esporas

Como se mencionó anteriormente del suelo del primer muestreo se extrajeron las esporas siguiendo la técnica de tamizado húmedo, decantación y de gradientes de densidad modificada de Brundrett *et al.* (1996). Una vez obtenidas las esporas de las 15 muestras por categoría de fragmento, fueron montadas y cuantificadas (Apéndice 2). Se contó el número de esporas por preparación y por morfoespecie y se expresó como el número de esporas por 50 g de suelo seco, de esta forma, se obtuvo un total de 15 preparaciones para el conjunto de fragmentos chicos y 15 para el conjunto de los grandes (Hernández-Cuevas *et al.*, 2008).

La identificación de las esporas fue realizada por la M. en C. Laura Hernández Cuevas, en el Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Para la determinación de las especies fueron consultados el Manual para la identificación de HMA (Schenk y Pérez, 1990), la información del Internacional Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM), a través de la página web invam.caf.wvu.edu/myc_info/taxonomy así como las descripciones de diferentes especies que aparecen en la página web <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/index.html>. La clasificación de los HMA se enuncia de acuerdo con la propuesta de la página web: <http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo>.

5.4.2 Número de propágulos infectivos y colonización micorrízica

Las raíces fueron aclaradas y teñidas según la técnica de Phillips y Hayman (1970) (Apéndice 3). Las raíces mejor teñidas fueron seleccionadas y cortadas en segmentos de 2 cm de largo aproximadamente, antes de ser montadas. Se colocaron 30 segmentos por laminilla y se fijaron con PVLG (alcohol polivinílico).

La estimación del porcentaje de colonización total y por estructura se llevó a cabo sólo en las preparaciones de la dilución “0”, a través del método de Mc Gonigle *et al.* (1990), con el propósito de obtener una estimación más aproximada a las condiciones originales de los fragmentos ya que el suelo de esas macetas no fue diluido (Apéndice IV).

Para estimar el número más probable de propágulos infectivos, al revisar las preparaciones también se utilizó el método de Mc Gonigle *et al.* (1990), pero sólo se registró la presencia o ausencia de colonización sin cuantificar las raíces colonizadas y sin importar el tipo de propágulo que estuviera colonizando la raíz. Así, se realizó un cuadro por fragmento, de cinco columnas por 10 renglones, donde cada columna representó una réplica y cada renglón una dilución (Ramos-Zapata *et al.*, 2008).

5.5 Análisis de datos

5.5.1 Esporas de hongos micorrizógenos arbusculares

Se calculó la diversidad de HMA para los fragmentos chicos y grandes con el índice de Simpson. Este parámetro fue calculado utilizando el programa BioDiversity Professional Beta (Mc Aleece, 1997). Se comparó la composición de especies de HMA de las dos categorías de fragmentos (chicos y grandes) con el índice de similitud de Bray-Curtis, que considera tanto la presencia y la ausencia de las especies, así como sus abundancias y enfatiza la importancia de las especies que existen en común entre los sitios de muestreo (Pileou, 1984). Estos análisis fueron llevados a cabo con el programa EstimateS versión 8.0 (Colwell, 2006).

En cuanto al número de esporas, se analizaron las diferencias entre categorías de fragmentos y especies usando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, transformando el número de esporas con el $\log(x+1)$, donde x es el dato observado respectivo (Zar, 1999). En caso de detectarse diferencias significativas con el ANOVA, se aplicó una prueba de Tukey de comparación múltiple de medias. Este análisis se procesó con el programa Statistica versión 6.0 (StatSoft, 2000).

5.5.2 Porcentaje de colonización micorrízica de HMA

Se obtuvieron los porcentajes de colonización total por dilución (PCTd) y fragmento, y por cada estructura fúngica (PCTe) (sólo para la dilución “0” de cada fragmento) (Apéndice 4).

Los porcentajes totales de colonización por dilución fueron transformados con $\log(x+1)$, con el fin de cumplir con los supuestos del ANOVA de dos vías que se realizó para detectar diferencias debidas a la dilución y el fragmento. También se efectuó un ANOVA de una vía para analizar las diferencias en el porcentaje por estructura entre fragmentos. Se utilizó el programa Statistica versión 6.0 (StatSoft, 2000) para dichos análisis. Posteriormente, si algún factor generó diferencias significativas o la interacción fue significativa se aplicó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey para identificar las medias diferentes.

5.5.3 Determinación del número más probable de propágulos infectivos de HMA

Se calculó el número de propágulos infectivos de HMA con la ecuación de Porter (1979) para cada uno de los fragmentos estudiados (un total de cinco) (Apéndice 1).

6. RESULTADOS

6.1 Estructura de la comunidad de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) del inóculo proveniente de fragmentos de dos tamaños diferentes

Para este análisis, se consideraron las 15 muestras de 50 g de suelo seco obtenidas de los fragmentos chicos, y sólo 11 de las 15 de los grandes ya que en cuatro de éstas no se registraron esporas de HMA.

6.1.1 Riqueza y abundancia de esporas de HMA

Se identificaron 19 especies de hongos micorrizógenos arbusculares en total, que correspondieron a cinco géneros: *Glomus*, *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. Sólo siete especies estuvieron presentes en ambos tamaños de fragmento, *Glomus tenebrosum*, *G. fulvum*, *G. verruculosum*, *G. microaggregatum*, *G. geosporum*, *Acaulospora scrobiculata* y *A. spinosa* (Cuadro 2).

La mayor riqueza observada se presentó en la categoría de fragmento grande con 15 especies, mientras que la de fragmento chico presentó 11 (Figura 8). De igual manera, el mayor número de especies esperado se encontró en fragmento grande (18) y el menor en fragmento chico (15) (Figura 4).

Cuadro 2. Morfoespecies de hongos micorrizógenos arbusculares encontradas en las categorías de fragmentos chicos y grandes. Los números corresponden al número total de esporas por especie (en 750 g de suelo seco).

Especie	Fragmentos chicos	Fragmentos grandes	Abundancia total
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	37	46	83
<i>Glomus tenebrosum</i>	49	14	63
<i>Acaulospora spinosa</i>	11	16	27
<i>Glomus geosporum</i>	11	12	23
<i>Glomus microaggregatum</i>	8	9	17
<i>Acaulospora foveata</i>	0	13	13
<i>Glomus aggregatum</i>	0	7	7
<i>Glomus verruculosum</i>	4	2	6
<i>Glomus claroideum</i>	0	4	4
<i>Glomus fulvum</i>	1	2	3
<i>Glomus sinuosum</i>	0	3	3
<i>Acaulospora morrowae</i>	3	0	3
<i>Scutellospora gilmoreii</i>	0	3	3
<i>Glomus clavisporum</i>	2	0	2
<i>Glomus rubiforme</i>	3	0	3
<i>Acaulospora mellea</i>	2	0	2
<i>Acaulospora laevis</i>	0	1	1
<i>Archaeospora leptoticha</i>	0	1	1
<i>Gigaspora decipiens</i>	0	1	1
Total	131	134	265

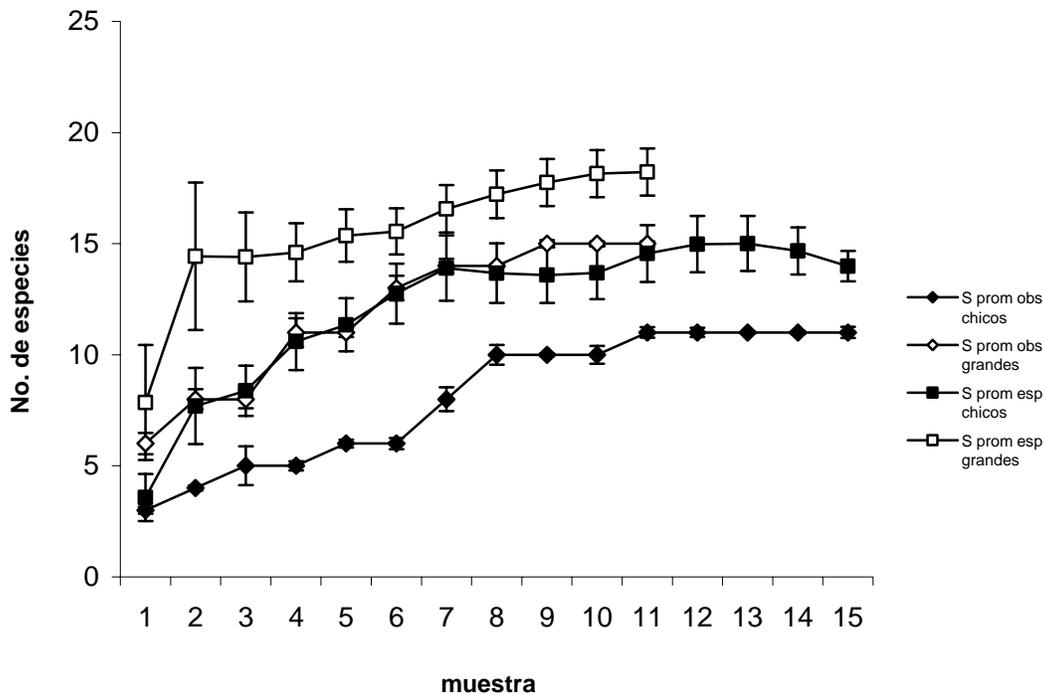
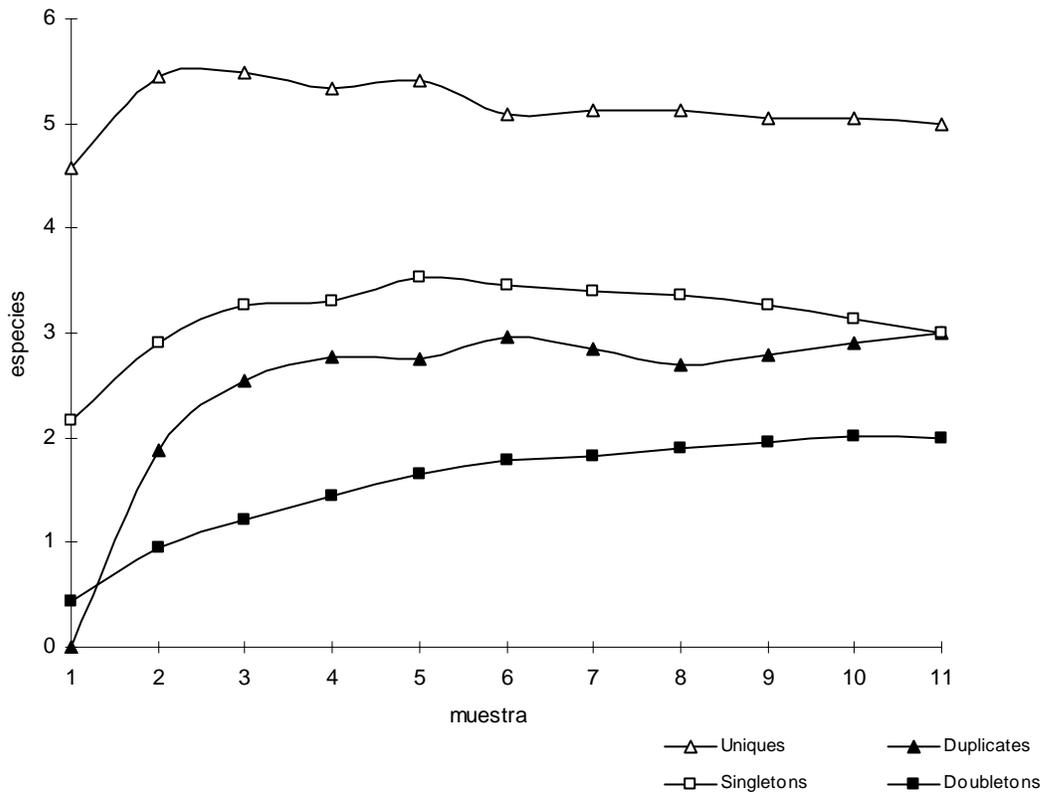


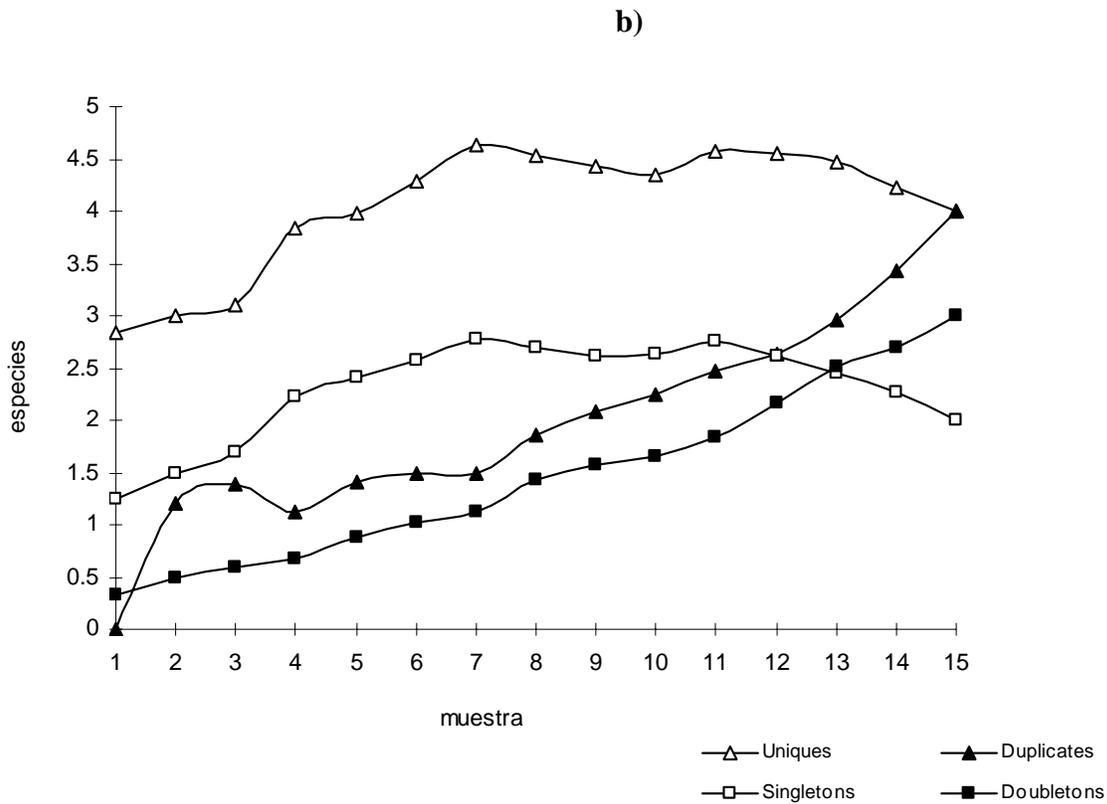
Figura 4. Riqueza promedio (± 1 E.E.) de hongos micorrizógenos arbusculares, observada y esperada, para fragmentos grandes y chicos en función del número de muestras que sí presentaron especies de HMA (11 y 15, respectivamente). S prom obs = riqueza promedio observada. S prom esp = riqueza promedio esperada.

Al llevar a cabo el análisis en función de las especies raras (aquellas que se presentan en números muy bajos) se observó que en el fragmento grande, la curva acumulativa de especies muestra que los singletons (morfoespecies que tuvieron un “individuo”) y doubletons (morfoespecies que tuvieron “dos individuos”) tienden a la estabilidad a partir de la muestra 8 al igual que los uniques (morfoespecies encontradas en una sola muestra), mientras que los duplicates (morfoespecies encontradas en dos muestras) aumentan conforme se incrementa el número de muestras (Figura 5a); en el fragmento chico, la curva no muestra una tendencia clara a la estabilidad, ya que los singletons y uniques tienden a disminuir, mientras que los doubletons y duplicates van en aumento (Figura 5b) conforme aumenta el número de muestras.

En el fragmento grande, se encontraron tres morfoespecies con una espora (singletons) y una morfoespecie con dos esporas (doubletons), cinco morfoespecies encontradas solamente en una muestra (uniques) y tres morfoespecies encontradas en dos muestras (duplicates) (Figura 5a). En el fragmento chico se encontraron dos morfoespecies con un individuo (singletons) y una morfoespecie con dos individuos (doubletons), cuatro morfoespecies encontradas en una muestra y dos morfoespecies en dos muestras (Figura 5b). Por lo tanto, el mayor número de singletons, uniques y duplicates lo presentó el fragmento grande, mientras que el fragmento chico presentó el mismo número de doubletons que el grande (Figuras 5 a y b).

a)





Figuras 5. Curvas acumulativas de las especies raras (singletons, doubletons, uniques y duplicates) promedio en función del número de muestras. a) Fragmentos de selva alta perennifolia grandes; b) Fragmentos de selva alta perennifolia chicos.

En ambos fragmentos, los géneros *Glomus* y *Acaulospora* tuvieron la mayor riqueza, presentando un total de diez y seis especies, respectivamente (Figura 6), en la categoría de fragmento grande se encontraron ocho especies del género *Glomus* y cuatro de *Acaulospora*, mientras que en la de fragmento chico hubo siete y cuatro especies, respectivamente (Cuadro 3). Los géneros *Archaeospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora* se encontraron representados con una especie cada uno (Figura 6) (Cuadro 3).

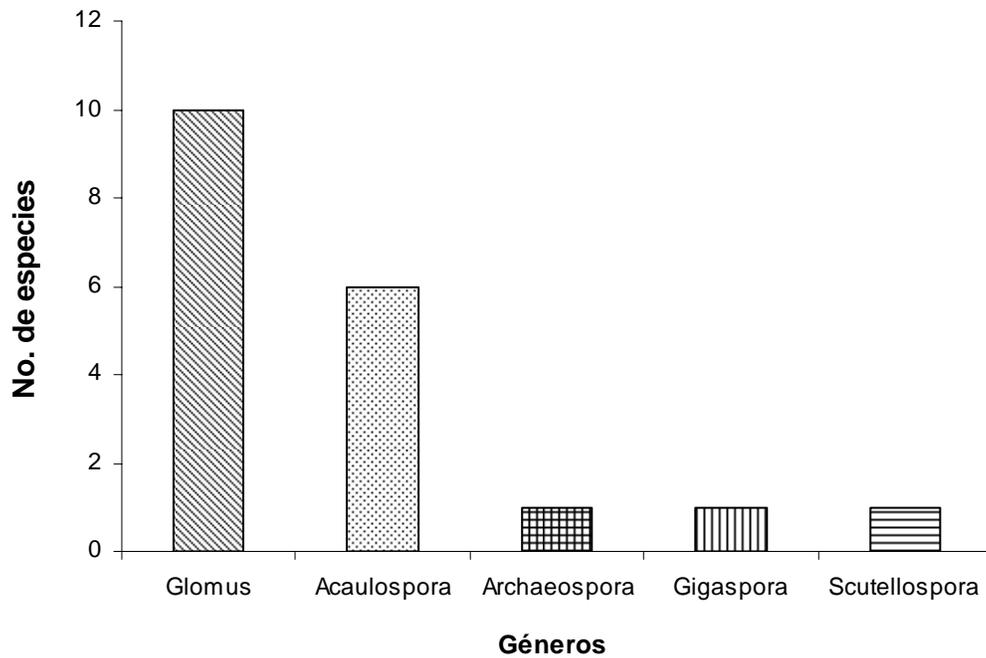


Figura 6. Número total de especies de los cinco géneros de hongos micorrizógenos arbusculares que se presentaron tanto en fragmentos grandes como chicos en Los Tuxtlas, Veracruz.

Glomus tenebrosum (63 esporas), *G. microaggregatum* (17), *G. geosporum* (23), *Acaulospora scrobiculata* (83), *A. spinosa* (27) y *A. foveata* (13) tuvieron el mayor número total de esporas (Cuadro 1). En cuanto a las especies con menor número de esporas encontramos a *Acaulospora laevis*, *Archeospora leptoticha* y *Gigaspora decipiens* con una sola espora cada una y sólo presentes en los fragmentos grandes (Figura 7).

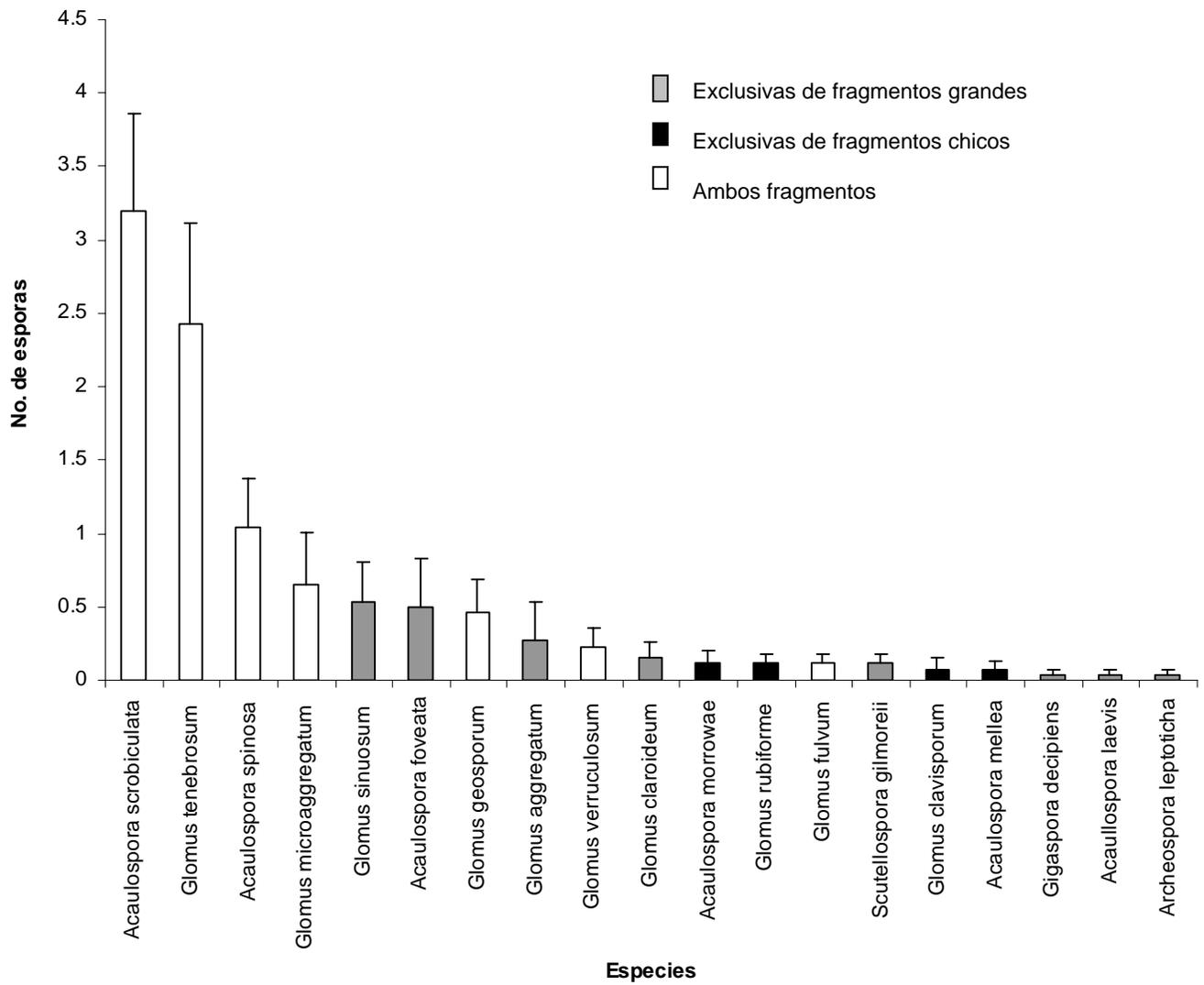


Figura 7. Número promedio (+1E.E.) de esporas en 50 g de suelo seco de todas las especies de HMA encontradas en la categoría de fragmentos, tanto chicos como grandes, de selva alta perennifolia.

6.1.2 Número de esporas

La categoría de los fragmentos grandes presentó un total de 134 esporas mientras que los chicos tuvieron 131. El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre fragmentos ($F_{1, 580} = 1.57, P > 0.01$). Los fragmentos grandes presentaron el menor número de esporas promedio con $7.05 (+13.95)$ en 50 g de suelo y los chicos de $6.89 (+14.55)$ en 50 g de suelo (Figura 8).

Los géneros *Glomus* y *Acaulospora* tuvieron el mayor número de esporas promedio en ambas categorías de fragmentos comparados con los otros géneros, siendo mayores las cantidades en el fragmento grande (12.67 ± 7.26 y 5.83 ± 1.78 , respectivamente) que en el fragmento chico (8.83 ± 5.87 y 3.5 ± 1.98 , respectivamente) (Figura 9).

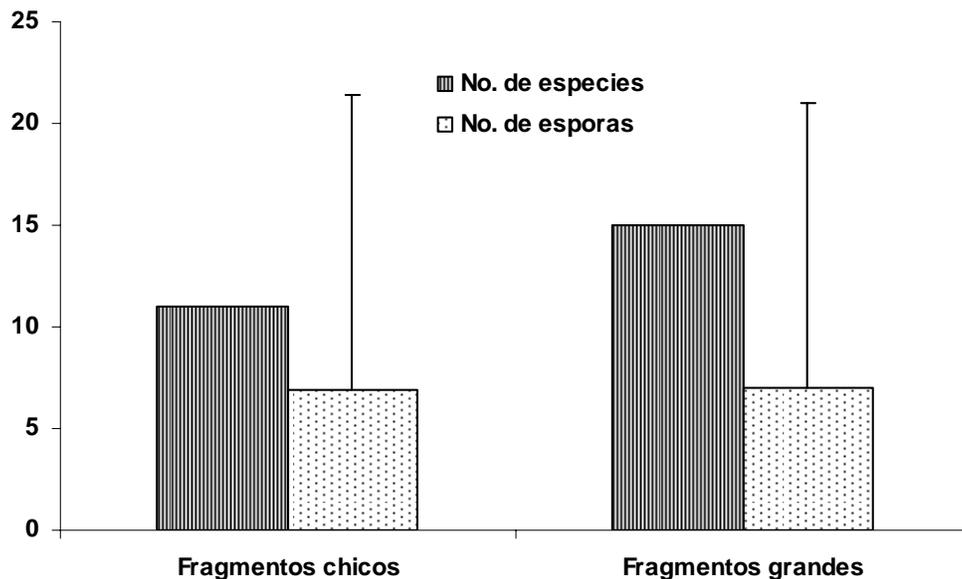


Figura 8. Número total de especies y número de esporas promedio (+1E.E.) de hongos micorrizógenos arbusculares por tamaño de fragmento.

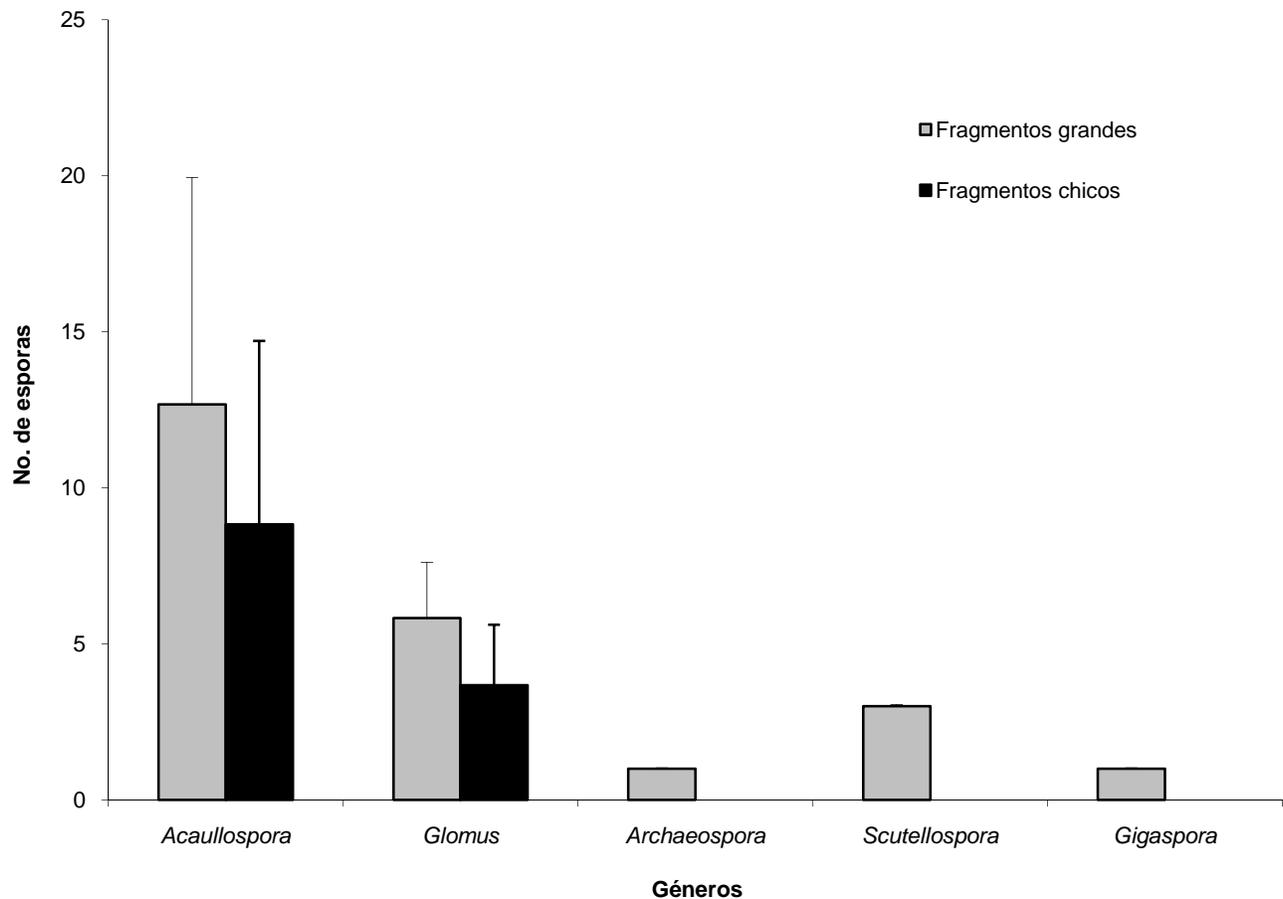


Figura 9. Número promedio ($\pm 1E.E.$) de esporas por cada género de hongos micorrizógenos arbusculares en fragmentos chicos y grandes de Los Tuxtlas, Veracruz.

En cuanto al factor especie, el análisis de varianza mostró diferencias significativas ($F_{19, 580} = 10.81$, $P < 0.01$) asimismo, la interacción especie/sitio también fue significativa ($F_{19, 580} = 1.87$, $P < 0.01$). El factor especie formó tres grupos claramente diferenciados, el primero formado por *Acaulospora scrobiculata* la especie con el mayor número de esporas promedio (3.19 ± 0.67); el segundo grupo formado por 13 especies representadas cada una de ellas por lo menos por dos a tres esporas (0.08 ± 0.05 a 0.65 ± 0.35) y el tercero formado por las especies con el menor número de esporas, *Archeospora leptoticha*, *Acaulospora laevis* y *Gigaspora decipiens* (0.32 ± 0 el mismo para cada una). Cabe destacar que *Glomus tenebrosus* y *Acaulospora spinosa* formaron otro grupo, sin embargo, no son diferentes de los grupos a y c, respectivamente. Asimismo, forman un continuo entre

A. scrobiculata (a) y el grupo c (Figura 10a).

Para la interacción, la prueba de Tukey mostró que las especies presentes en ambos fragmentos con mayor número de esporas fueron *A. scrobiculata*, *G. tenebrosum* y *A. spinosa*. *A. scrobiculata* y *A. spinosa* tuvieron el mayor número de esporas en los fragmentos grandes y el menor en los chicos y *G. tenebrosum* presentó mayor número de esporas en los fragmentos chicos que en los grandes. Otras cuatro especies, *G. fulvum*, *G. microaggregatum*, *G. sinuosum* y *G. verruculosum* se presentaron en ambos fragmentos, sin embargo, las dos primeras tuvieron mayor número de esporas en los grandes que en los chicos, lo contrario sucedió con las dos últimas especies. Con respecto a las especies que estuvieron presentes sólo en los fragmentos grandes se encuentran *A. foveata*, *G. geosporum*, con mayor número de esporas si se comparan con *G. aggregatum*, *G. claroideum*, *A. laevis*, *Gigaspora decipiens*, *Scutellospora gilmoreii* y *Archaeospora leptoticha*, que forman el grupo con el menor número de esporas; en cuanto a los fragmentos chicos, se encontraron exclusivamente *G. rubiforme*, *G. clavisporum*, *A. morrowae* y *A. mellea* con bajo número de esporas (Figura 10b).

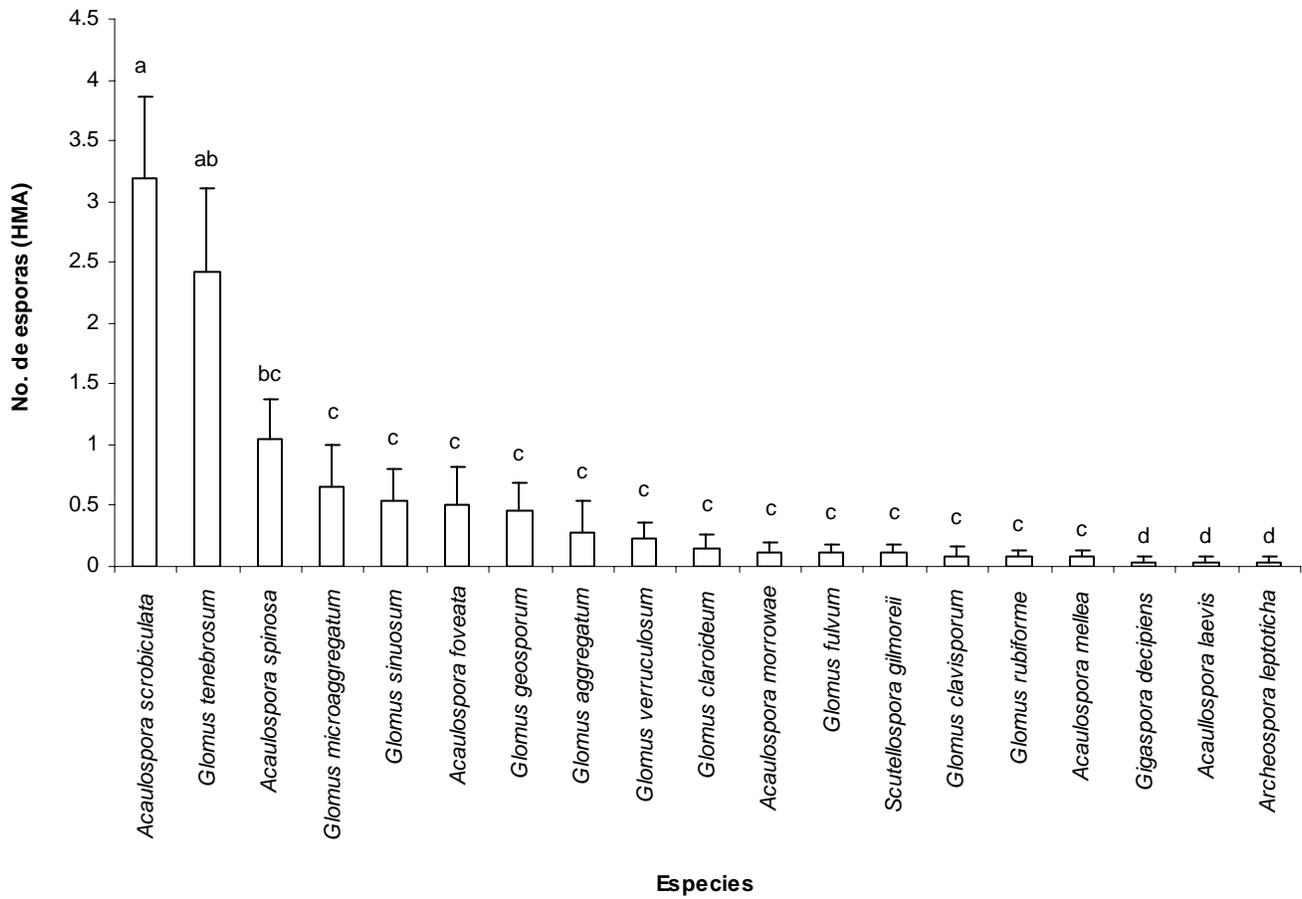


Figura 10a. Número promedio de esporas (+1E.E.) por especie; letras diferentes indican medias significativamente diferentes.

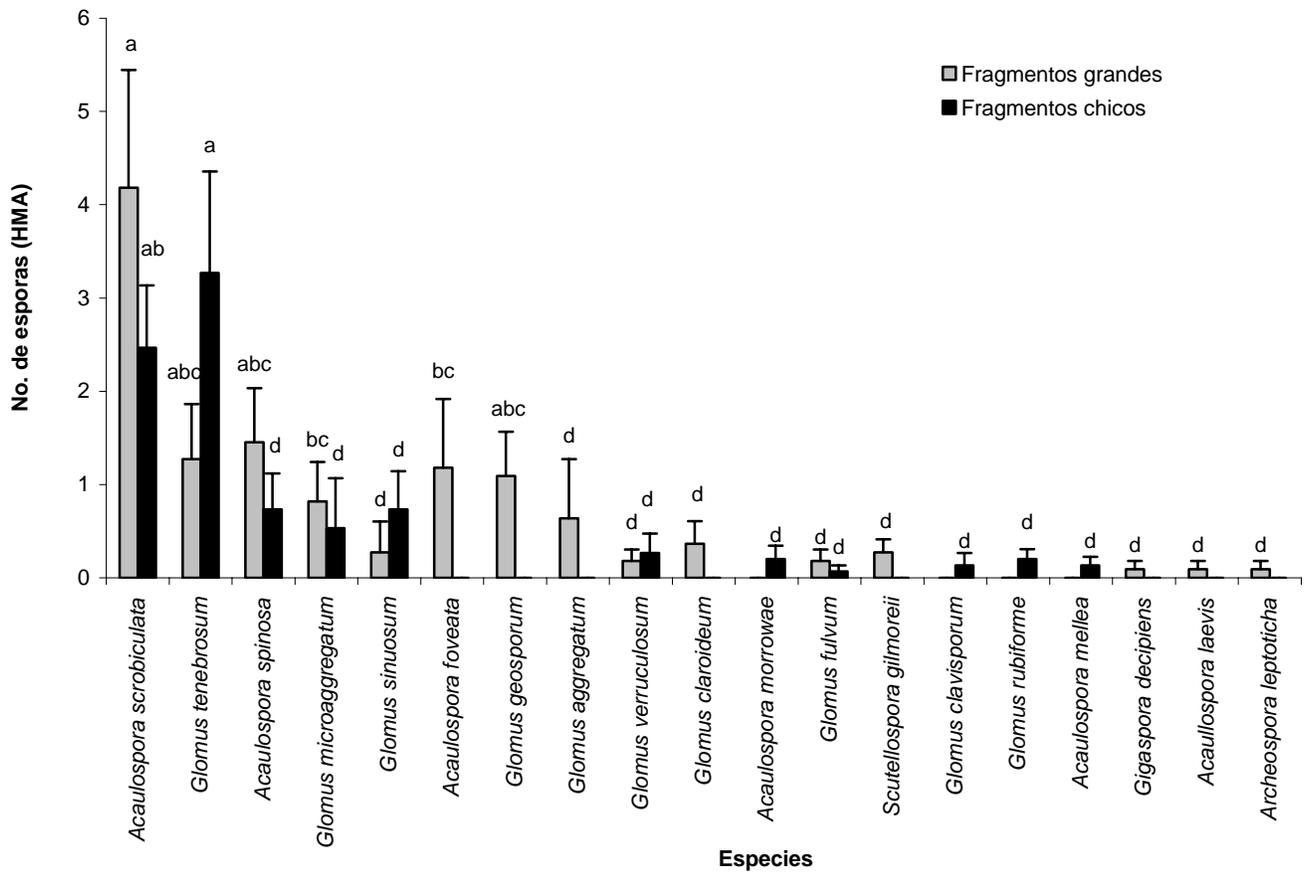


Figura 10b. Número promedio de esporas (+1E.E.) por especie tanto en fragmentos grandes como chicos; letras diferentes indican medias significativamente diferentes.

6.1.3 Índices de diversidad y similitud

El promedio del índice de Simpson calculado para cada categoría de fragmentos varió; los fragmentos grandes fueron los más diversos (3.54 ± 0.37) comparados con los fragmentos chicos (2.98 ± 0.40).

El índice de similitud de Bray-Curtis mostró una similitud del 57% entre categoría de fragmento chico y grande lo cual indica que ambos tipos de fragmentos comparten más del 50% de las especies de HMA encontradas.

6.2 Potencial de colonización del inóculo de HMA en fragmentos de diferentes tamaños

6.2.1 Porcentaje de colonización total en función del número de propágulos infectivos

En promedio, los fragmentos grandes tuvieron $\lambda = 12\,709 \pm 3\,436.3$ propágulos infectivos en 50 g de suelo, mientras que los fragmentos chicos tuvieron $\lambda = 9\,246 \pm 3\,991.7$ propágulos. Sin embargo, el mayor porcentaje de colonización total promedio correspondió a los fragmentos chicos, con 32% (± 5.03), mientras que los grandes tuvieron un porcentaje de 21.67 (± 3.36), aunque al analizar los porcentajes entre fragmentos chicos y grandes no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 3).

Al hacer el análisis por cada fragmento, el sitio de 3 ha y el de 211 tuvieron el mismo número de propágulos infectivos, 9 273.51. De igual manera, el fragmento de 640 hectáreas y el de 5 tuvieron el mismo número de propágulos, 16 146.11, mientras que el fragmento con el menor número de propágulos fue el de 7 hectáreas con 2 318.38 (Figura 11) (Cuadro 3).

El análisis de varianza mostró diferencias significativas por el factor sitio en el porcentaje de colonización total ($F_{4, 200} = 11.54$, $P < 0.01$) y al aplicar la prueba de Tukey se mostró que el fragmento más pequeño, el de 3 hectáreas, presentó el mayor porcentaje de colonización (15.91 ± 2.34), mientras que el de 211 hectáreas, con igual número de propágulos obtuvo el menor porcentaje de colonización (6.73 ± 1.19) (Figura 12). En cuanto a los fragmentos de 640 y 5 hectáreas, tuvieron un porcentaje de colonización semejante de 11.09 (± 1.36) y 8.44 (± 1.17), respectivamente (Figura 12). El fragmento de 7 ha tuvo un porcentaje de 8.38 (± 1.35), muy parecido al del fragmento más grande (Figura 12) (Cuadro 3).

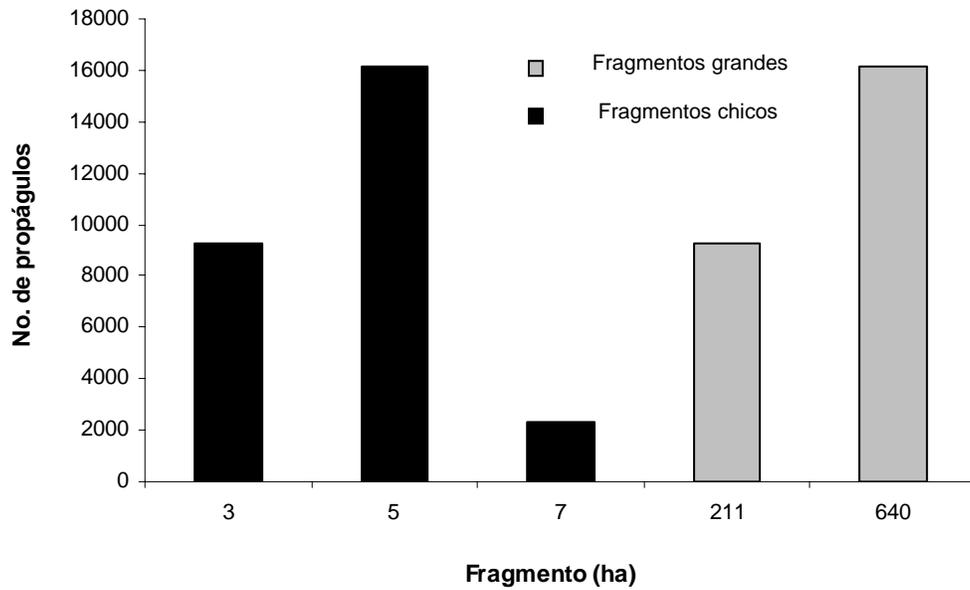


Figura 11. Número total de propágulos infectivos en 50 g de suelo seco de sitios de diferente tamaño de selva alta perennifolia.

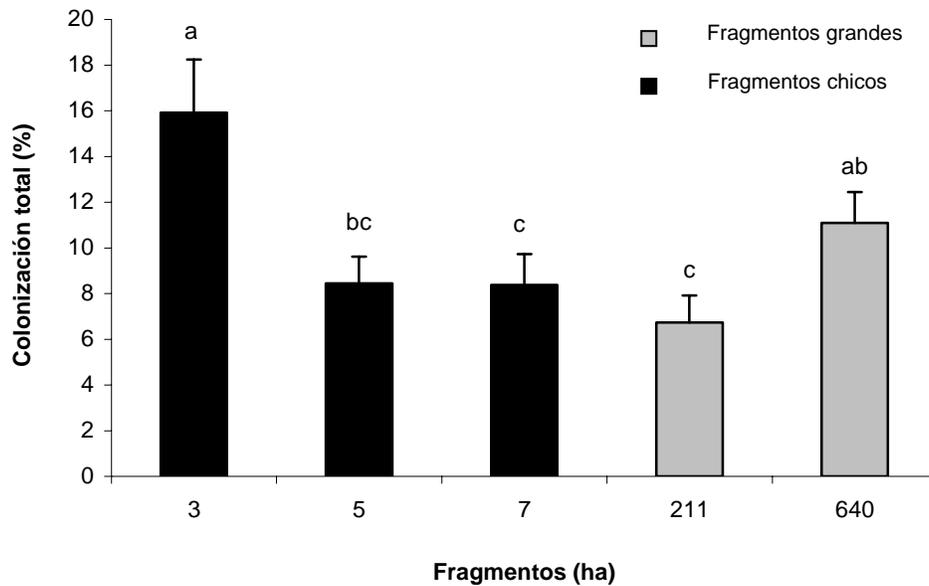


Figura 12. Porcentaje de colonización total promedio (+1E.E.) por fragmento de selva alta perennifolia; letras diferentes indican medias significativamente diferentes.

6.2.2 Porcentaje de colonización total en función de la dilución

El análisis de varianza también mostró diferencias significativas dadas por el factor dilución en el porcentaje de colonización total ($F_{9, 200} = 41.50$ $P < 0.01$). El mayor porcentaje de colonización fue registrado en la dilución 0, mientras que el menor porcentaje se encontró en la dilución 8 (Figura 13). La interacción dilución y fragmento sí fue significativa ($F_{36, 200} = 0.96$ $P < 0.01$), y al aplicar la prueba de Tukey se observó que los menores porcentajes de colonización total se presentaron en todos los fragmentos para las diluciones mayores, 7 y 8, mientras que el mayor porcentaje se observó en los sitios de 640 y 3 hectáreas en las diluciones cero y tres (Figuras 14 a y b).

El fragmento de 211 ha desde un principio, antes de ser diluido, presentó bajos porcentajes de colonización total, que disminuyeron aún más conforme se diluyó el suelo, excepto en la dilución 3 (Figura 14a). Mientras que el fragmento de 3 ha, en general, presentó los valores más altos de colonización sin importar la dilución, lo que lo hace un fragmento muy interesante si además se considera que no tuvo el mayor número de propágulos (Figura 14b). En general, es posible afirmar que los suelos de los fragmentos de menor superficie generan porcentajes de colonización mayores a los suelos de fragmentos grandes, al menos en las primeras tres diluciones, de tal forma que a pesar de estar diluido el suelo, su potencial de colonización tiende a mantenerse.

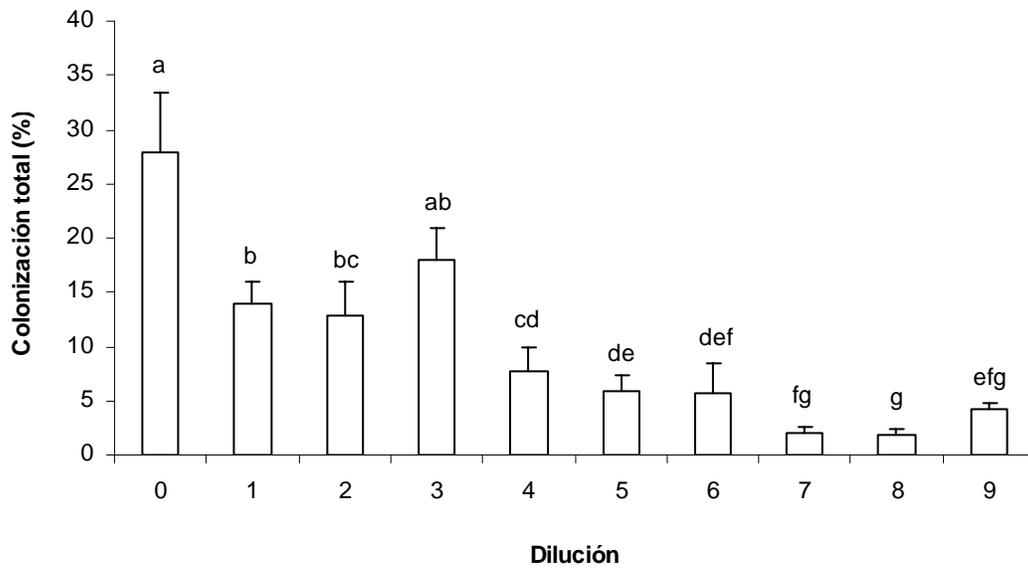


Figura 13. Porcentaje de colonización total promedio (+1E.E.) para cada dilución; letras diferentes indican medias significativamente diferentes.

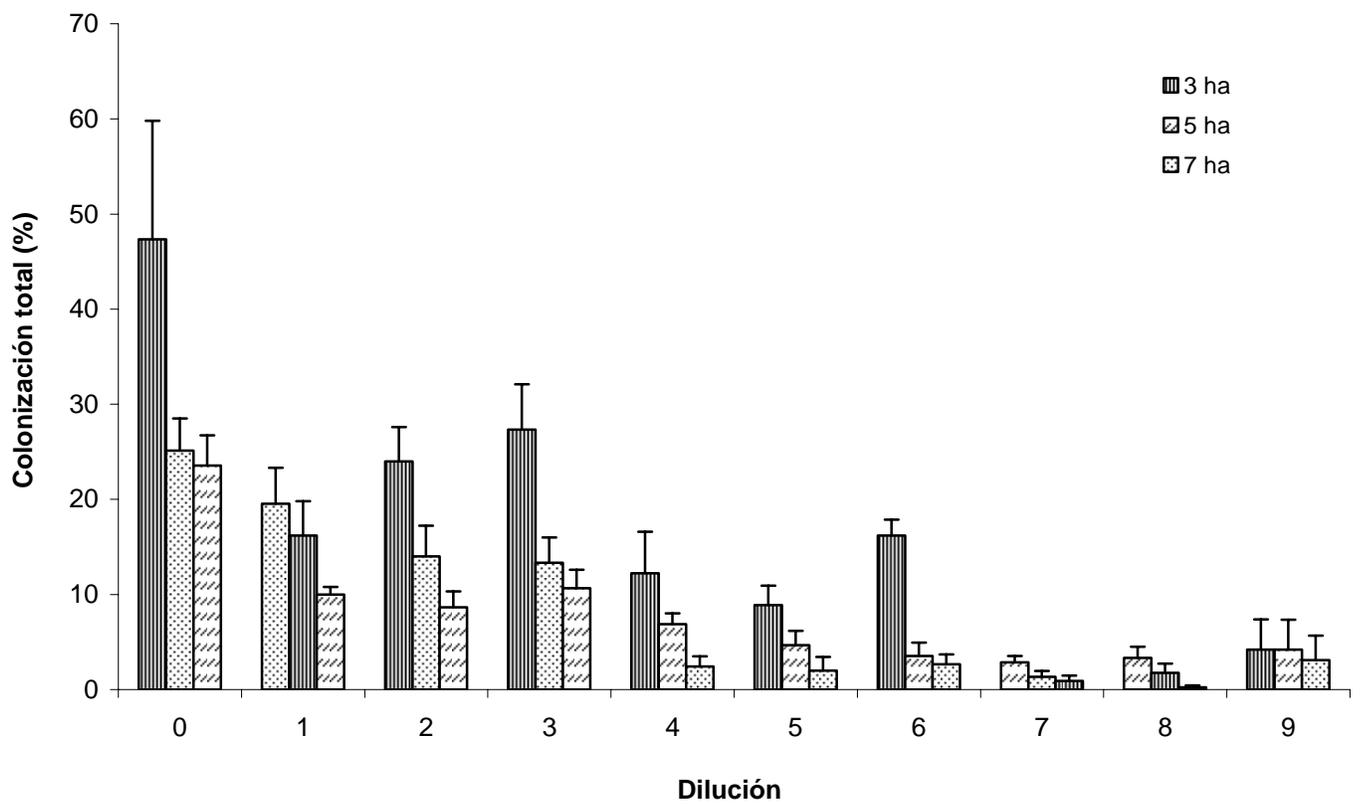
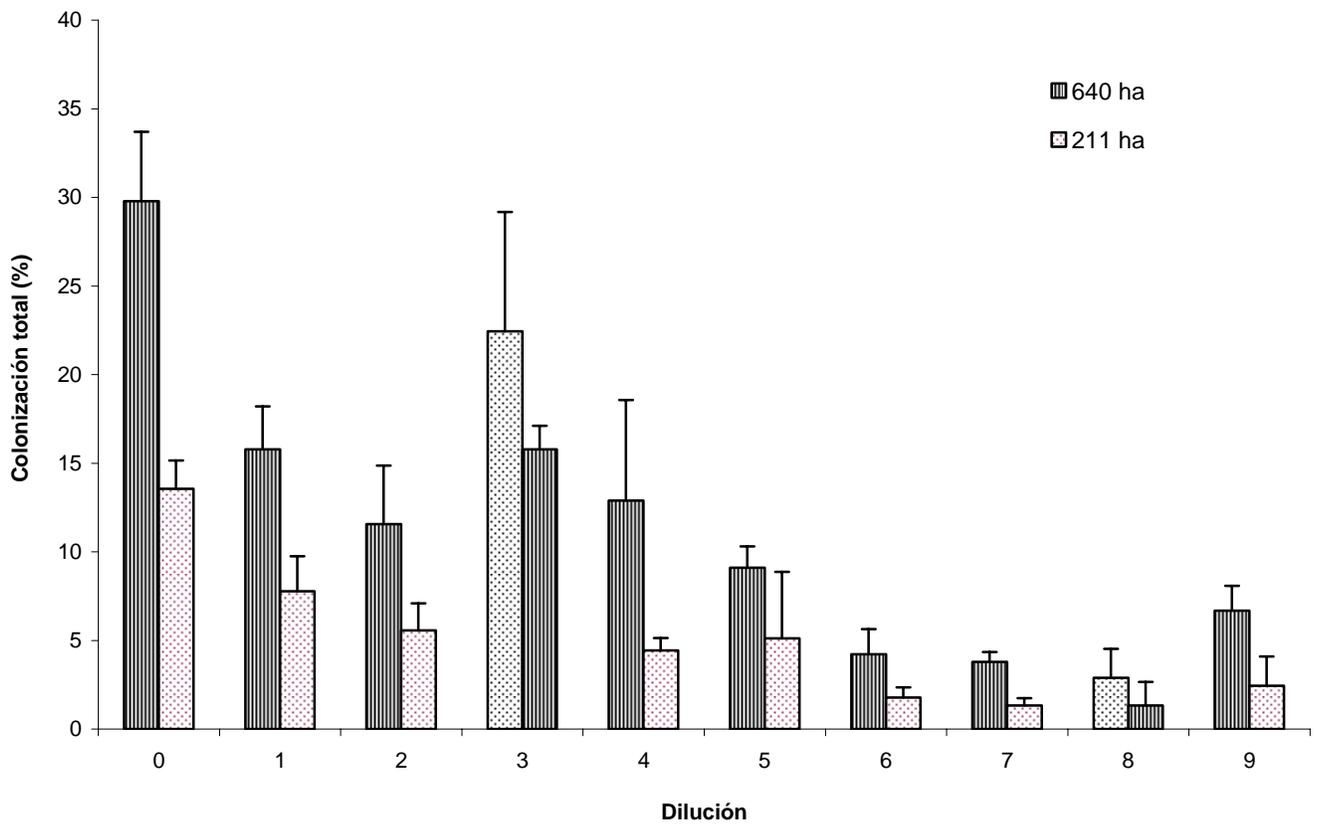


Figura 14. Porcentaje de colonización total (+1E.E.) por dilución. a) Fragmentos de selva alta perennifolia grandes y b) Fragmentos de selva alta perennifolia chicos.

En cuanto a los porcentajes de colonización por estructura, el análisis resultó significativo sólo para hifas. Los mayores porcentajes fueron del fragmento de 3 ha (38.67 ± 10.51) y del fragmento de 640 (26.67 ± 2.98), mientras que el menor fue el del fragmento de 211 (11.11 ± 1.96). Lo cual indica que tanto el fragmento de 640 como el de 3 tienen potenciales de colonización muy semejantes (Figura 15), a pesar de que el de 3 tiene un menor número de propágulos que el de 640.

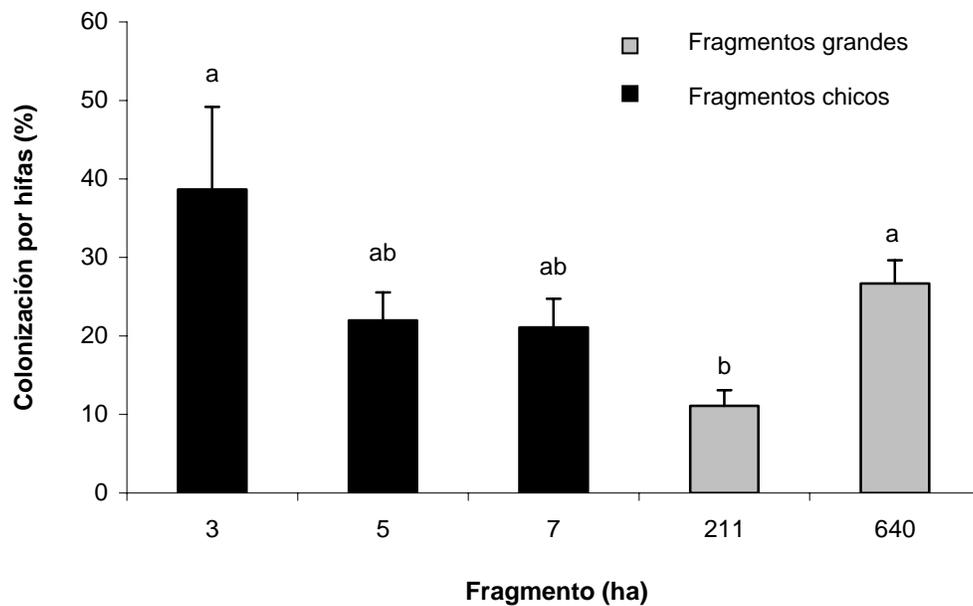


Figura 15. Porcentaje de colonización por hifas promedio (+1E.E) para los fragmentos de selva alta perennifolia; letras diferentes indican medias significativamente diferentes.

Cuadro 3. Resultados más importantes del inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares, proveniente de fragmentos chicos y grandes de la selva alta perennifolia de Los Tuxtlas, Veracruz.

Géneros encontrados		Fragmentos chicos (ha)				Fragmentos grandes (ha)			
		3	5	7	Total	211	640	Total	
<i>Glomus</i>	No. de especies					7			8
	No. de esporas					78			51
<i>Acaulospora</i>	No. de especies					4			4
	No. de esporas					53			76
<i>Gigaspora</i>	No. de especies					0			1
	No. de esporas					0			1
<i>Scutellospora</i>	No. de especies					0			1
	No. de esporas					0			3
<i>Archaeospora</i>	No. de especies					0			1
	No. de esporas					0			1
Número total de propágulos		9,273.51	16,146.11	2,318.38	27,738	9,273.51	16,146.11	25,419.62	
% Colonización total promedio		15.91 (± 2.34)	8.44 (± 1.17)	8.38 (± 1.35)	32 (± 5.03)	6.73 (±1.19)	11.09 (± 1.36)	21.67 (±3.36)	

7. DISCUSIÓN

7.1 Composición de la comunidad de HMA

En sistemas como las selvas altas perennifolias de nuestro país, la comunidad de HMA ha sido poco estudiada y todos los estudios al respecto, se basan en la determinación de especies a partir de esporas de campo (Ramírez-Gerardo *et al.*, 1997; Guadarrama y Álvarez, 1999; Varela *et al.*, 2008), con diferentes objetivos, métodos de muestreo y en diferentes sitios con respecto al presente trabajo, por lo que la comparación taxonómica entre los listados de especies de HMA obtenidos es muy limitada y puede ocasionar problemas de sobre o subvaloración de los datos. Es importante considerar todas estas circunstancias como posibles sesgos que pueden influir en la determinación taxonómica de las especies de HMA a partir de las esporas de campo (Rosendahl, 2007). Entre ellas podemos mencionar, de manera más específica, las siguientes: a) es probable que las esporas obtenidas en los momentos de muestreo definidos en los diferentes estudios hayan estado tan dañadas, que en algunos casos, su identificación sólo pudo aproximarse hasta nivel de género y en otros hasta especie; b) se ha observado una esporulación diferencial en diferentes géneros dependiendo de las condiciones ambientales que varían de acuerdo a la estacionalidad del sitio de estudio, c) la cantidad de muestras obtenidas en cada uno de los estudios y el volumen de cada una de ellas influye en la presencia o ausencia de algunas especies de HMA, d) el grado de disturbio del sitio y las condiciones de estrés que éste conlleva ya que existen algunas especies que suelen ser menos tolerantes al disturbio y, por lo tanto, se promueve su esporulación y como resultado es posible obtener una mayor cantidad de esporas en comparación con otras especies; y e) la naturaleza agregada de los HMA que impide obtener la mayor representatividad de sus esporas si se muestrea aleatoriamente.

En este trabajo, se encontró que siete especies de las 19 reportadas aquí (Cuadro 2) correspondientes a los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, se encuentran en todos los fragmentos (Cuadro 3), lo cual sugiere una amplia distribución de estos géneros y, por lo tanto, una alta capacidad de

asociarse a una gran diversidad de especies vegetales sin importar las condiciones microambientales del suelo, el tamaño y la condición del fragmento. De hecho, se ha reportado que estos géneros son más resistentes al disturbio del suelo (Boddington y Dodd, 2000) y, por lo tanto, pueden encontrarse en ambientes deteriorados tales como los fragmentos chicos, sin embargo, también se ha reportado su presencia en ambientes conservados como los fragmentos grandes (Guadarrama y Álvarez-Sánchez, 1999).

Tres de estas siete especies, *Acaulospora scrobiculata*, *A. spinosa* y *Glomus geosporum* se encuentran por primera vez para los fragmentos de selva alta perennifolia de Los Tuxtlas, ya que anteriormente fueron reportadas por Guadarrama y Álvarez (1999) para la región, pero de sitios con cierto grado de disturbio como los claros de selva y pastizales. De acuerdo con Schenck y Pérez (1990) las dos primeras especies habían sido reportadas para selva alta perennifolia en México, pero no para Los Tuxtlas. Lo mismo sucede con *Gl. geosporum* anteriormente encontrada por Allen *et al.*, (1998) en la selva baja caducifolia de Chamela, México.

Los géneros *Glomus* y *Acaulospora* se han asociado con diferentes ambientes con suelos relativamente ácidos (Souza *et al.*, 2003), lo que podría explicar por qué encontramos diferentes especies de estos géneros tanto en fragmentos grandes como en chicos, ya que el pH de los suelos de esta región es menor a 6. Sin embargo, especies como *A. foveata*, *A. laevis*, *Glomus aggregatum*, *Gl. claroideum* y *Gl. sinuosum* fueron encontradas exclusivamente en los fragmentos grandes, mientras que *A. morrowae*, *A. mellea*, *Gl. clavissporum* y *Gl. rubiforme* fueron reportadas para los chicos (Cuadro 2). Mangan *et al.* (2004) reportan, en concordancia con nuestros datos, que *A. mellea* se encuentra asociada a fragmentos con menor área. Por el contrario, la especie *Gl. clavissporum* es reportada por Mangan *et al.* (2004) para un área con mayor tamaño, equivalente a lo que nosotros definimos como fragmentos grandes, lo que no coincide con los resultados aquí obtenidos, ya que se le encontró sólo en

fragmentos chicos, es importante realizar otros muestreos subsecuentes porque durante la época en que se realizó el muestreo tal vez esta especie no esporuló en los fragmentos grandes, de tal manera que de muestrear en más puntos dentro de nuestros fragmentos grandes *Gl. clavisporum* se presente.

De acuerdo con los datos del número de especies estimado, y dado que no se alcanzó una asíntota, el número de especies observado por categoría de fragmento es menor al que se podría esperar (Figura 2), por lo que es probable que con un mayor número de muestras se encontraría una mayor riqueza de especies, lo cual está sustentado con otros estudios de hongos micorrizógenos arbusculares para la región de Los Tuxtlas (Varela *et al.* 2008), en donde se han reportado un total de 60 especies, más del 60% de las que nosotros obtuvimos. Como ya se mencionó, un aspecto muy importante de estos hongos, es que la descripción de las morfoespecies se lleva a cabo con las esporas y en muchas ocasiones éstas solo se obtienen en el suelo de campo, donde suelen ser muy pocas y estar expuestas a diferentes factores, como depredadores, parásitos y sequía, entre otros, que alteran sus características morfológicas, de tal manera que se dificulta o hace imposible su identificación. Por ello, con el fin de incrementar el número de esporas factibles de ser identificadas, es decir, no alteradas morfológicamente, y tener una mayor aproximación de la riqueza de especies, es fundamental considerar más muestreos, ya que la esporulación de los HMA no ocurre durante todo el año, debido a que depende de factores tales como la disponibilidad de agua y temperatura, así como la fenología del hospedero, en diferentes épocas y años. Además, independientemente de lo anterior, es necesario colocar macetas de propagación con suelo del sitio de estudio, a fin de obtener el mayor número de esporas viables y en buen estado físico para facilitar su determinación taxonómica y tener un listado más completo de los sitios.

La presencia de *Gigaspora decipiens* y *Scutellospora gilmoreii* en los fragmentos grandes (Cuadro 2 y 3) puede ser indicadora de un mayor grado de conservación de tal categoría de fragmento,

dado que existen estudios que señalan que los miembros de estos géneros son menos tolerantes al disturbio, comparados con los de los géneros *Glomus* y *Acaulospora* (Klironomos y Hart, 2002; Allen *et al.*, 2003), los cuales son capaces de producir un mayor número de esporas independientemente de las condiciones ambientales donde se desarrollen.

La presencia de una única spora de *Archaeospora leptoticha*, solamente en los fragmentos grandes (Cuadro 2 y 3) es de destacarse ya que anteriormente se le registró en pastizales y milpas de la región de Los Tuxtlas (Varela *et al.*, 2008), que son ambientes con alto disturbio, por lo que se podría sugerir la adaptación de esta especie a ambientes perturbados. Aunque esta suposición se contrapone a nuestro supuesto de que los fragmentos grandes están más conservados, la cantidad de esporas reportada para pastizal es mucho mayor que la que nosotros reportamos (36 esporas para pastizales y una en milpas), lo que indicaría que el disturbio promueve una mayor esporulación de esta especie; el hallarse ante una situación de bajo disturbio, como la que se infiere para los fragmentos grandes, presupone una menor producción de esporas, como la que se encontró en el estudio.

Cabe destacar que la especie *Glomus constrictum*, reportada por otros estudios en Los Tuxtlas y de manera abundante, tanto en pastizales como en selva (Ramírez-Gerardo *et al.*, 1997; Guadarrama y Álvarez-Sánchez, 1999; Varela *et al.*, 2008) no fue registrada en nuestros fragmentos, esto es de llamar la atención porque el registro de *Gl. constrictum* en ambientes tan contrastantes, indica la adaptación de esta especie a condiciones estables, como las de los fragmentos grandes de selva, y a condiciones de alto estrés, como las de los pastizales, por lo que los niveles de conservación o perturbación no explican su presencia.

A una escala espacial regional no encontramos que el tamaño del fragmento influya sobre el número de esporas promedio, independientemente de la especie de HMA. Sin embargo, sí encontramos

una relación en cuanto al número de esporas y categoría de fragmento para ciertas especies, ya que en los fragmentos grandes *Acaulospora scrobiculata* presentó el mayor número de esporas (46 esporas en 50 g de suelo) y el menor (37 esporas en 50 g de suelo) en los fragmentos chicos, por lo que, su relación es directamente proporcional al tamaño; mientras que en los fragmentos chicos la especie con el mayor número de esporas es *Glomus tenebrosum* (49 esporas), sin embargo el número de esporas de esta especie en los fragmentos grandes es menor (14 esporas), es decir, su relación es inversamente proporcional. Lo anterior, coincide con lo reportado por Mangan *et al.* (2004), quienes mencionan que tanto la identidad de las especies como su número de esporas depende del tamaño del fragmento, esto puede ser debido a que las condiciones microambientales en cada categoría de fragmento son diferentes y favorecen la presencia de ciertas especies vegetales y, por lo tanto, fúngicas, dada cierta afinidad con algunas especies vegetales que se ven favorecidas en su desempeño por la asociación con los HMA.

De manera global, los fragmentos grandes son más ricos que los chicos, lo cual concuerda con lo esperado, ya que los fragmentos grandes están más conservados y presentan una mayor diversidad vegetal, que puede estar directamente relacionada con la fúngica (van der Heijden *et al.*, 1998). Sin embargo, al analizar la curva acumulativa de especies de HMA raras, la diferencia es mínima, ya que los fragmentos grandes superan en solo una especie rara a los fragmentos chicos. Con respecto a las especies raras, determinadas por la abundancia de uniques, singletons, duplicates y doubletons, en el caso de fragmentos grandes, las curvas alcanzan su asíntota; en los chicos únicamente los uniques y singletons declinan con el aumento de muestras, mientras que los duplicates y doubletons no alcanzan una estabilidad, es decir, que si llegase a aumentar el número de muestras, estos dos últimos también tenderían a aumentar (Rico-Gray *et al.*, 2005).

También, se ha relacionado la riqueza observada de especies raras con la diversidad y conservación de un sitio (Halffter y Ezcurra, 1992; Kershaw *et al.*, 1995), de tal forma, que a mayor

número de especies raras se esperaría una mayor diversidad y un ambiente más conservado (Armbrecht y Ulloa-Chacón, 1999), como es el caso de los fragmentos grandes que poseen la mayor diversidad y riqueza observada de especies raras de HMA, considerando la riqueza esperada de las especies raras, los fragmentos chicos también presentan una tendencia al aumento, lo cual indica que pueden ser sitios de gran diversidad fúngica y conservados, contrario a lo esperado. Sin embargo, los estudios que han estimado la diversidad a partir de las especies raras se basan en animales, con individuos que pueden ser claramente diferenciados entre sí (Armbrecht y Ulloa-Chacón, 1999; Rico-Gray *et al.*, 2005). En el caso de los HMA, no existen estudios que muestren datos sobre las especies raras, debido a que hasta el momento no es posible determinar que las esporas obtenidas en las muestras provengan de un mismo individuo o sean de diferentes (Rosendahl, 2007).

Una explicación para la alta diversidad fúngica en los fragmentos chicos puede ser su relación con una alta diversidad vegetal (van der Heijden *et al.*, 1998), hecho que se ha demostrado en estos sitios de estudio (Sánchez-Gallen *et al.*, en prep.); también otra explicación complementaria es que el suelo ha amortiguado, a nivel hipogeo los cambios en las condiciones ambientales, tal que éstas no son tan diferentes a aquéllas encontradas en los fragmentos grandes, a pesar de que en la parte aérea sí se observan cambios. Una característica edáfica muy importante para el desarrollo de las comunidades microbianas es la estabilidad de las condiciones microambientales (p.e. pH, temperatura, humedad, concentración de nutrientes), y que, a pesar de que ocurren cambios ambientales drásticos en la zona aérea, éstos no se reflejan en la parte hipogea, de esta manera, organismos como los HMA no se ven afectados en su riqueza de especies y abundancias (Beauchamp *et al.*, 2006; van der Heijden *et al.*, 2008).

Todo lo anterior apunta a que, contrario a lo esperado, los fragmentos chicos tienen alta diversidad fúngica muy semejante a la de los fragmentos grandes, a pesar de su tamaño y esto trae

como consecuencia, dentro de un paisaje tan fragmentado como es el caso de la región de Los Tuxtlas, que pueden funcionar como puentes entre diferentes parches, promoviendo la alta conectividad espacial del paisaje en un mosaico de vegetación.

7.2 Número más probable de propágulos infectivos y potencial de colonización de HMA

En este estudio al comparar el potencial de inóculo entre fragmentos grandes y chicos encontramos que los primeros tienen, en promedio, un número mayor de propágulos infectivos que los últimos, lo cual parecería indicar que, a pesar de que ambas categorías sostienen una alta diversidad de HMA, ésta no influye en la capacidad de inoculación. Si consideramos que los fragmentos chicos (< 10 ha) son más susceptibles al deterioro debido a que tienen una zona de amortiguamiento menor y una zona de borde mayor (Turner, 1996; Santos y Tellería, 2006), tal que los cambios en las condiciones ambientales son más drásticos, entonces nuestros datos del potencial de inóculo se ajusta a lo reportado en otros estudios, donde reportan niveles bajos de propágulos en ambientes deteriorados (Jasper *et al.*, 1989, 1991; Boerner *et al.*, 1996; Gould *et al.*, 1996, Corkidi y Rincón, 1997).

Por otra parte, la composición de HMA y el número de propágulos indican la capacidad de colonización de las raíces de las plantas, así como su infectividad (Tovar-Franco, 2006). De esta forma, el alto número de propágulos de un suelo está relacionado con altos niveles de colonización micorrízica, mientras que un número menor de propágulos está relacionado con una lenta y poco efectiva colonización (Carling *et al.*, 1979; Nehl *et al.*, 1999). Sin embargo, por categorías de fragmento la relación es inversa, lo cual indica que a esta escala el número de propágulos no influye sobre la capacidad de infección de los HMA en las raíces de las plantas. En este caso, los factores que pueden influir sobre el nivel de colonización son la cantidad de fósforo en el suelo y la identidad de las especies de HMA y de plantas (Guadarrama *et al.*, 2004a).

La cantidad de P disponible en el suelo puede ser una limitante para la colonización de las raíces de las plantas por HMA, específicamente, las altas concentraciones de P disponible en el suelo disminuyen el nivel de colonización micorrízica, debido a que como las plantas pueden tomar directamente del suelo el P que requieren para sus funciones, sin necesidad de asociarse con los HMA, los gastos energéticos que implica la relación son menores, independientemente del número de propágulos de HMA (Koide y Li, 1991; Smith y Read, 1997; Wiseman y Wells, 2005). Este hecho coincide con el presente estudio ya que en promedio hay una baja concentración de fósforo lábil ($7 \text{ ppm} \pm 0.92$) en suelos de fragmentos chicos, mientras que para los fragmentos grandes es casi del doble ($12 \text{ ppm} \pm 1.83$) (Sánchez-Gallen, datos no publicados).

También, la identidad de las especies fúngicas es muy importante, especies de los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* poseen un micelio robusto y con hifas densamente agregadas que permiten explorar una longitud mayor de suelo y le confieren a la planta una mayor área de captación de nutrientes, por ello ésta asigna más fotosintatos a ellos que a sus propias raíces, pero debido al estado de latencia que presentan sus esporas y a los requerimientos específicos para su germinación, su capacidad para colonizar las raíces de las plantas es más lenta comparada con la del género *Glomus* (Hart y Reader, 2002; Klironomos y Hart, 2002). Es posible que el bajo porcentaje de colonización en los fragmentos grandes se deba por una parte a esta lenta capacidad de colonización de los géneros *Scutellospora* y *Gigaspora* que estuvieron presentes en tales fragmentos, y por otra al alto contenido de fósforo disponible en el suelo, que puede ser absorbido directamente por las plantas sin la mediación por HMA, por lo que éstas asignan menor energía a la asociación con dichos hongos. Mientras que en los fragmentos chicos, la mayor presencia de especies del género *Glomus* y el bajo contenido de fósforo disponible en el suelo pueden explicar el alto porcentaje de colonización micorrízica. Hart y Reader (2002) y Klironomos y Hart (2002) reportaron que este género presenta un micelio delicado y con hifas difusas que le permite colonizar una mayor longitud de raíces que de suelo, a través de

cualquiera de sus propágulos, desarrollando hacia el interior de la raíz un extenso micelio altamente infectivo, es por esto que la colonización es mucho más rápida comparada con los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* y, por lo tanto, puede esperarse una mayor colonización transcurrido el mismo tiempo.

En el caso de los fragmentos por separado, existen diferencias contrastantes de su potencial de inóculo. Los fragmentos de 640 ha y 5 ha presentan el mayor número de propágulos y porcentajes semejantes de colonización seguidos del de 3 ha (Cuadro 3), lo cual indica un buen estado de conservación de ambos fragmentos, aún cuando el segundo presenta menor área. El fragmento de 3 ha y el fragmento de 211, tuvieron el mismo número de propágulos, sin embargo, el mayor porcentaje de colonización lo presentó el fragmento con menor área, mientras que el segundo presentó el menor porcentaje de todos los fragmentos (Figura 11) (Cuadro 3). Estos datos reiteran que el tamaño del fragmento no está influyendo sobre la infección micorrízica, sino otros factores tales como la cantidad de fósforo disponible en el suelo, así como la composición vegetal del fragmento.

Particularmente, el fragmento de 3 ha tiene un nivel de fósforo disponible muy bajo (5 ± 1.29 ppm) (Sánchez-Gallen *et al.*, datos no publicados). Como se ha mencionado, las bajas concentraciones de fósforo disponible en el suelo promueven la asociación HMA-planta, debido a que la absorción de este nutriente por parte de las raíces de las plantas es limitada (Abbott y Robson, 1991) y, por tanto, el potencial de colonización de los HMA se puede incrementar independientemente de la cantidad de propágulos que presente dicho sitio.

En el caso del fragmento de 211 ha, su porcentaje de colonización micorrízica es mucho menor comparado con el de 3 ha, aún cuando tienen el mismo número de propágulos (Figura 10) (Cuadro 3); asimismo, el fragmento de 7 ha presentó el menor número de propágulos y un porcentaje de colonización un poco mayor al de 211 ha (Cuadro 3). Es posible que el alto contenido de P disponible

en el suelo de los fragmentos de 211 y 7 ha ($15 \text{ ppm} \pm 2.74$ y $11 \text{ ppm} \pm 2.27$, respectivamente) limite el nivel de colonización micorrízica, por lo que las plantas no necesitan de la asociación con los HMA. Cabe destacar, que en este estudio no se analizó la relación entre la composición vegetal de los fragmentos y si ésta tiene alguna influencia sobre los niveles de colonización encontrados en este estudio, pero es muy posible que las diferentes historias de vida de las plantas en los fragmentos de diferente tamaño influyan en su asociación con los HMA y sobre todo su nivel de colonización.

La cantidad de propágulos infectivos encontrados en las primeras diluciones fue alta y conforme se aumentó la dilución, la cantidad de propágulos disminuyó, lo cual coincidió con lo reportado por Garza-Requena y Valdés (2000).

Finalmente, una variable no considerada en ningún estudio sobre número de propágulos y porcentaje de colonización, pero que tal vez tenga alguna influencia, sobre todo por su efecto sobre la vegetación, es la distancia de los fragmentos con menor área al fragmento más grande y conservado. En este estudio, esta variable puede estar influyendo en los resultados del número de propágulos infectivos y porcentaje de colonización total, ya que los fragmentos más cercanos al fragmento de 640, 3, 5 y 211 ha con 2357.84, 2348.94 y 1792.35 m, respectivamente, tienen valores mayores de dichas variables que el de 7 ha que está un poco más alejado (2774.38 m), sin embargo, no es clara la razón del por qué de esa relación.

7.3 Técnica del número más probable de propágulos infectivos

La técnica aquí empleada para evaluar el número de propágulos infectivos de una muestra permitió tener una aproximación del potencial de inóculo de la comunidad de HMA de diferentes fragmentos. Sin embargo, subestima la cantidad de inóculo debido a la naturaleza agregada de estos hongos, así como por diversos factores microambientales y del hospedero. Asimismo, esta técnica no valora la efectividad de los HMA en su hospedero, por lo que es conveniente no asociar la cantidad de propágulos de un suelo con la efectividad fúngica.

El método está sujeto a error, ya que además de tener efectos por el suelo diluido, muchas de sus características se pueden perder, también algunas macetas pueden contaminarse con propágulos de otras macetas próximas (Adelman y Morton, 1986; Franson y Bethlenfalvay, 1989). Por ejemplo, en nuestro caso las raíces del suelo de la máxima dilución presentaron alta colonización, debido probablemente a que pudieron contaminarse con propágulos de las macetas contiguas ya que no se mantiene a cada maceta aislada.

Otro aspecto muy importante que hay que considerar es que no necesariamente los resultados obtenidos a través de esta técnica se ajustan a las condiciones de campo, dado que las condiciones en invernadero pueden inducir la germinación de algunos propágulos, tales como fragmentos de raíces que en condiciones de campo no serían infectivos (Abbott y Robson, 1991). Es por ello que Pattinson y Mc Gee (1997) sugieren que al implementar esta técnica deben mantenerse las condiciones de temperatura y humedad lo más parecidas a las de campo y, sobre todo, se debe inocular una planta nativa del sistema para poder tener una aproximación más real de la relación planta-HMA en nuestro caso fue imposible ajustar exactamente las condiciones del invernadero a las de campo ($T= 24^{\circ}\text{C}$, $pp= 4100\text{mm}$) y con el fin de seguir de manera precisa el método para la estimación del potencial de inóculo se utilizó el sorgo, en lugar de especies nativas.

8. CONCLUSIONES

De manera general, se puede señalar que la categoría de fragmento no genera diferencias significativas en la riqueza y abundancia de especies de HMA.

Los resultados obtenidos señalan que el tamaño del fragmento no influye sobre la composición ni sobre el potencial de inóculo de HMA, pero factores como la concentración de fósforo lábil y la composición vegetal sí.

Nuestros datos sugieren que los fragmentos con una superficie pequeña sostienen una gran riqueza de especies de HMA, así como un alto número de propágulos infectivos y un alto potencial de colonización.

9. PERSPECTIVAS

Sugerimos la necesidad de evaluar los fragmentos de selva en términos de su estado físico: más propiedades del suelo, prácticas de manejo, composición vegetal y variables microambientales, y no en términos de su superficie como se ha propuesto hasta ahora, como futura estrategia de conservación de las selvas tropicales de nuestro país.

Es necesario ampliar los estudios sobre la calidad del inóculo de los fragmentos de selva en las especies vegetales nativas y evaluar su respuesta a largo plazo.

Es fundamental incentivar la investigación en estos pequeños parches, dadas sus características ecológicas particulares por su gran potencial en la conservación de las selvas altas perennifolias y de esta forma, generar información útil que permita conservar y restaurar las selvas húmedas de nuestro país desde el punto de vista de la biodiversidad del suelo, en especial, de los hongos micorrizógenos arbusculares.

10. LITERATURA CITADA

- Abbott, L. K. y Robson, A. D. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture Ecosystems and Environment* 35: 121-150.
- Adelman, M. J. y Morton, J. B. 1986. Infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture Ecosystems and Environment* 35: 121-150.
- Allen, M. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press, EU. 184 pp.
- Allen, E. B., Rincón, E., Allen, M. F., Pérez-Jiménez, A. y Huante, P. 1998. Disturbance and seasonal dynamics of mycorrhizae in a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 30: 261-274.
- Allen, E. B., Allen, M. F., Egerton-Warburton, L., Corkidi, L. y Gómez-Pompa, A. 2003. Impacts of early and late seral mycorrhizae during restoration in seasonal tropical forest, Mexico. *Ecological Applications* 13: 1701-1717.
- Álvarez-Sánchez, J., Guadarrama, P., Sánchez-Gallen, I. y Olivera, D. 2007. Restauración de ambientes deteriorados derivados de la selva tropical húmeda: el uso de los hongos micorrizógenos arbusculares. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 80: 59-68.
- Armbrecht, I. y Ulloa-Chacón, P. 1999. Rareza y diversidad de hormigas en fragmentos de bosque seco colombiano y sus matrices. *Biotropica* 31: 646-653.
- Arroyo-Rodríguez, V. y Mandujano, S. 2006. The importance of tropical rain forest fragments to the conservation of plant species diversity in Los Tuxtlas, Mexico. *Biodiversity and Conservation* 15: 4159-4179.
- Arroyo-Rodríguez, V., Aguirre, A., Benítez-Malvido, J. y Mandujano, S. 2007. Impact of rain forest fragmentation on the population size of a structurally important palm species: *Astrocaryum mexicanum* at Los Tuxtlas, Mexico. *Biological Conservation* 138: 198-206.
- Augé, R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens- an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Sachar-Hill, Y. y Pfeffer, P. E. 2000. El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. En: Alarcón, A. y R. Ferrera-Cerrato, R. (Eds.). *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Colegio de Postgraduados. Mundi Prensa. S. A. de C. V. México. 251 pp.
- Barea, J. M., Pozo, J. M., Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56: 1761-1778.

- Beauchamp, V. B., Stromberg, J. C. y Stutz, J. C. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Populus-Salix* stands in a semiarid riparian ecosystem. *New Phytologist* 170: 369–380.
- Bever, J. D. 2002. Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth. *Plant and Soil* 244: 281-290.
- Biermann, B. y Linderman, R. G. 1983. Mycorrhizal roots, intraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 95: 97-105.
- Boddington, C. L. y Dodd, J. C. 2000. The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. II. Studies in experimental microcosms. *Plant and Soil* 218:145–157.
- Boerner, R. E., DeMars, B. C y Leicht, P. N. 1996. Spatial patterns of mycorrhizal infectiveness of soils along a successional chronosequence. *Mycorrhiza* 6: 79-90.
- Brundrett, M. C. 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. C. y Abbott, L.K. 1995. Mycorrhizal fungus propagules in the jarrah forest. II. Spatial variability in inoculum levels. *New Phytologist* 131: 461–469.
- 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. 374 pp.
- Cagnolo, L., Cabido., M. y Valladares, G. 2006. Plant species richness in the Chaco Serrano woodland from Central Argentina: ecological traits, and habitat fragmentation effects. *Biological Conservation* 132: 510-519.
- Campos, A. 2004. El suelo. En: Guevara, S., J. Laborde y G. Sánchez-Ríos (Eds.). *Los Tuxtlas. El Paisaje de la Sierra*. Instituto de Ecología, A. C., Veracruz, México. pp. 181-192.
- Carling, D. E., Brown, M. F. y Brown, R. A. 1979. Colonization rates and growth responses of soybean plants infected by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 57: 1769-1772.
- Castillo-Campos, G. y Laborde, J. 2004. La vegetación. En: Guevara, S., J. Laborde y G. Sánchez-Ríos (Eds.). *Los Tuxtlas. El Paisaje de la Sierra*. Instituto de Ecología, A. C., Veracruz, México. pp. 231-270.
- Chizon, S. E. 1984. *Relación suelo-vegetación en la Estación de Biología de Los Tuxtlas, Veracruz.: Un análisis de la distribución de los diferentes tipos de suelo en relación con la cubierta vegetal que soporta*. Tesis de licenciatura. ENEP-Zaragoza, UNAM, México.

- Clark, R. B. 1997. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and Soil* 192: 15-22.
- Colwell, R. K. 2006. EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from simples. Versión 8. User's Guide and application published at <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>
- Corkidi, L. y Rincón, E. 1997. Arbuscular mycorrhizae in a tropical sand dune ecosystem on the Gulf of Mexico I. Mycorrhizal status and inoculum potential along a successional gradient. *Mycorrhiza*. 7: 9–15.
- Diagne, O., Ingleby, K., Deans, J. D., Lindley, D. K., Diatité, I. y Neyra, M. 2001. Mycorrhizal inoculum potential of soils from alley cropping in Sénegal. *Forest Ecology and Management* 146: 35-43.
- Filion, M., St Arnaud, M. y Fortin, J. A. 1999. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere micro-organisms. *New Phytologist* 141: 525-533.
- Fischer, C. R., Janos, D. P., Perry, D. A., Linderman, R. G. y Sollins, P. 1994. Mycorrhiza inoculum potential in tropical secondary succession. *Biotropica* 26: 369-377.
- Fisher, R. A. y Yates, F. 1970. *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. sexta edición. Hafner Publisher Compilation, Davieu, Connecticut, EU.
- Flores-Delgado, L., Sommer-Cervantes, I., Alcalá-Martínez, J. y Álvarez-Sánchez, J. 1999. Estudio morfo genético de algunos suelos de la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Ciencias Biológicas* 16: 81-88.
- Franson, R. L. y Bethlenfalvay, G. J. 1989. Infection unit method of vesicular-arbuscular mycorrhizal propagule determination. *Soil Science Society of America Journal* 53: 754-756.
- Friese, C. F. y Allen, M. F. 1991. The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia* 83: 409-418.
- García, J.A., Fuentes, T., Sosa, V., Meza, E., Negrete-Yankelevich, Barois, I., Bennack, D., Okoth, P. 2005. Benchmark site description of the Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Report of the Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity project* (UNEP-GEF, GF/2715-02). 49 pp.
- Garza-Requena, F. y Valdés, M. 2000. Tamaño de la población microbiana del suelo y desarrollo inicial de *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. *Agrociencia* 34: 445-451.
- Gavito, M. E. y Varela, L. 1993. Seasonal dynamics of mycorrhizal associations in maize fields under low input agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 45: 275-282.

- Gavito, M. E., Olsson, P. A., Rouhier, H., Medina-Peñañiel, A., Jakobsen, I., Bago, A. y Azcón-Aguilar, C. 2005. Temperature constrains on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 168: 179-188.
- Geissert, D. 2004. La geomorfología. En: Guevara, S., J. Laborde y G. Sánchez (Eds.). *Los Tuxtlas: El paisaje de la sierra*. Instituto de Ecología A. C. México. pp. 159-179.
- Gemma, J. N. y Koske, R. E. 1990. Mycorrhizae in recent volcanic substrates in Hawaii. *American Journal of Botany* 77: 1193-1200.
- George, E., Marschner, H. y Jakobsen, I. 1995. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Critic Review of Biotechnology* 15:257-270.
- Gerdemann, J. H. y Nicholson, T. H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- Gould, A. B., Hendrix, J. W. y Ferris, R. S. 1996. Relationships of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky. I Propagule and spore population densities. *Canadian Journal of Botany* 74: 247-261.
- Guadarrama, P. y Álvarez-Sánchez, 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, J. y Estrada-Torres, A. 2004a. Phosphorus dependence in seedlings of a tropical pioneer tree: The role of arbuscular mycorrhizae. *Journal of Plant Nutrition* 27: 1-6.
- Guadarrama, P., Álvarez-Sánchez, J. y Briones, O. 2004b. Seedling growth of two pioneer tropical tree species in Competition: The role of arbuscular mycorrhizae. *Euphytica* 138: 113-121.
- Guadarrama, P., Castillo-Argüero, S., Ramos-Zapata, J., Camargo-Ricalde, S. y Álvarez-Sánchez, J. 2008. Propagules of arbuscular mycorrhizal fungi in a secondary forest of Oaxaca, Mexico. *Journal of Tropical Biology* 56: 269-277.
- Guevara, S., Laborde, J. y Sánchez-Ríos, G. 2004. La deforestación. En: Guevara, S., J. Laborde y G. Sánchez-Ríos (Eds.). *Los Tuxtlas: El paisaje de la sierra*. Instituto de Ecología A. C. Veracruz, México. pp. 85-109.
- Halffter, G. y Ezcurra, E. 1992. ¿Qué es la biodiversidad? En: Halffter, G. (Ed.). *La diversidad biológica de Iberoamérica*. Acta Zoológica Mexicana, CYTED-D, Volumen especial, Programa Iberoamericano de ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Xalapa, México. pp. 3-24.
- 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.
- Hart, M. M., Reader, R. J. y Klironomos, J. N. 2003. Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 418-423.

- Hernández-Cuevas, L., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallén, I. y Ramos-Zapata, J. 2008. Micorriza arbuscular, colonización intraradical y extracción de esporas del suelo. En: Álvarez-Sánchez, J. y A. Monroy-Ata, (Eds.). *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. pp. 1-15.
- Hill, J. L. y Curran, P. J. 2003. Area, shape and isolation of tropical forest fragments: effects on tree species diversity and implications for conservation. *Journal of Biogeography* 30: 1391-1403.
- 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.
- Janos, D. P. 1980a. Mycorrhizae influence tropical sucesión. *Biotropica* 12: 56-64.
- Janos, D. P. 1980b. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology* 61: 151-162.
- Janos, D. P. 1992. Heterogeneity and scale in tropical vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. En: Read, D. J., D. H. Lewis, A. H. Fitter y I. J. Alexander (Eds.) *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB International. Oxford, Inglaterra. pp. 276-282.
- Janos, D.P. 1995. Rodent dispersal of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in amazonian *Peruvian Ecology* 76:1852-1858.
- Jasper, D. A., Abbot, L. K. y Robson, A. D. 1989. Soil disturbance reduces the infectivity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 112: 93-99.
- Jasper, D. A., Abbot, L. K. y Robson, A. D. 1991. The effect of soil disturbance on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soils from different vegetation types. *New Phytologist* 118: 471-476.
- Kershaw, M., Mace, G. M. y Williams, P. H. 1995. Threatened status, rarity and diversity as alternative selection measures for protected areas: a test using Afrotropical antelopes. *Conservation Biology* 9: 324-334.
- Kiers, E. T., Lovelock, C. E., Krueger, E. L. y Herre, E. A. 2000. Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecology Letters* 3: 106-113.
- Koide, R. T. y Li, M. G. 1991. Mycorrhizal fungi and the nutrient ecology of three old field annual plant species. *Oecologia* 85: 403-412.
- Koske, R. E. 1987. Distribution of VA mycorrhizal fungi along a latitudinal temperature gradient. *Mycologia* 79: 55-68.
- Klironomos, J. N. y Hart, M. M. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12: 181-184.

- Laurance, W. F., Delamônica, P., Laurance, S. G., Vasconcelos, H. L. y Loveloy, T. E. 2000. Rainforest fragmentation kills big trees. *Nature* 404: 836-842.
- Laurance, W. F., Nascimento, H. E. M., Laurance, S. G., Andrade, A. C., Fearnside, P. M., Ribeiro, J. E. L. y Capretz, R. L. 2006. Rain forest fragmentation and the proliferation of successional trees. *Ecology* 87: 469-482.
- Linderman, R. G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rizosphere microflora. The mycorrhizosphere effects. *Phytopathology* 78: 366-371.
- Lot-Helgueras, A. 1976. La Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas: pasado, presente y futuro. En: Gómez-Pompa, A. Amo del S., C. Vázquez-Yanes, y A. Butanda. (Eds.) *Regeneración de Selvas*. Volumen I. INIREB, CECSA. México. pp 31-69.
- Lovelock, C. E. y Ewel, J. J. 2005. Links between tree species, symbiotic fungal diversity and ecosystem functioning in simplified tropical ecosystems. *New Phytologist* 167: 219-228.
- Mangan, S. A., Eom, A. H., Adler, G. H., Yavitt, J. B. y Herre, E. A. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi across a fragmented forest in Panama: insular spore communities differ from mainland communities. *Oecologia* 141: 687-700.
- Mc Alece, N. 1997. *BioDiversity Professional Beta 2.0*. The Natural History Museum.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L. y Swan, J. A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495-501.
- Mendoza, E., Fay, J. y Dirzo, R. 2005. A quantitative analysis of forest fragmentation in Los Tuxtlas, southeast Mexico: patterns and implications for conservation. *Revista Chilena de Historia Natural* 78: 451-467.
- Menéndez, A. B., Scervino, J. M. y Godeas, A. M. 2001. Arbuscular mycorrhizal populations associated with natural and cultivated vegetation on a site of Buenos Aires province, Argentina. *Biology and Fertility of Soils* 33: 373-381.
- Miranda, F y Hernández-X, E. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 28:29-178.
- Molino, R. y Amaranthus, M. 1990. Rizosphere Biology: ecological linkages between soil processes, plant growth and community dynamics. En: Harvey, A. y L. Neuenschwander (Eds.). *Symposium on Management and Productivity of Western Montane Forest Soil*. Idaho, EU. pp. 10-12.
- Monz, C. A., Hunt, H. W., Reeves, F. B. y Elliot, E.T. 1994. The response of mycorrhizal colonization to elevated CO₂ and climate change in *Pascopyron smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Plant and Soil* 165: 75-80.

- Morton, J. B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267-324.
- Nadian, H., Smith, S. E., Alston, A. M. y Murray, R. S. 1996. The effect of soil compaction on growth and P uptake by *Trifolium subterraneum*: interactions with mycorrhizal colonization. *Plant and Soil* 182: 39-49.
- Nehl, D. B., McGee, P. A., Torrisi, V., Pattinson, G. S. y Allen, S. J. 1999. Patterns of arbuscular mycorrhiza down the profile of a heavy textured soil do not reflect associated colonization potential. *New Phytologist* 142: 495-503.
- Nelson, S. A. y González-Caver, E. 1992. Geology and K-Ar dating of the Tuxtla volcanic field, Veracruz, Mexico. *Bulletin of Volcanology* 55: 85-96.
- Newsham, K. K., Fitter, A. H. y Watkinson, A. R. 1994. Root pathogenic and arbuscular mycorrhizal fungi determine fecundity of asymptomatic plants in the field. *Journal of Ecology* 82: 805-814.
- Newsham, K. K., Fitter, A. H. y Watkinson, A. R., 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 407-411.
- Núñez-Castillo, O. y Álvarez-Sánchez, J. 2003. Arbuscular mycorrhizae of the palm *Astrocaryum mexicanum* in disturbed and undisturbed stands of a Mexican tropical forest. *Mycorrhiza* 13: 271-276.
- 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 agroecosystems of central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816-2824.
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Ris, A., Boller, T. y Wiemken, A. 2005. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist* 165: 273-283.
- Pattinson, G. S. y Mc Gee, P. A. 1997. High densities of arbuscular mycorrhizal maintaining during long fallows in soils used to grow cotton except when soil is wetted periodically. *New Phytologist* 136: 571-580.
- Pattinson, G. S., Hammill, K. A., Sutton, B. G. y Mc Gee, P. A. 1999. Simulated fire reduces the density of arbuscular mycorrhizal fungi at the soil surface. *Mycological Research* 103: 491-496.
- Pawlowska, T. E. y Chavart, I. 2002. Influence of edaphic and environmental factors of arbuscular mycorrhizae.. En: Sharma, A. y B. Jhori (Eds.). *Arbuscular Mycorrhizae interactions in plants rhizosphere and soils*. Science publishers, Inc., Enfield, NH. EU. pp. 105-134.

- Peña-Becerril, J., Monroy-Ata, A. y Álvarez-Sánchez, J. 2005. Uso del efecto de borde de la vegetación para la restauración ecológica del bosque tropical. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 8: 91-98.
- Phillips, J. M. y Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycology Society* 55: 158-161.
- Pielou, E. C. 1984. *The interpretation of ecological data*. Wiley New York, EU. 263 pp.
- Plenchette, C. Perrin, R. y Duvert, P. 1989. The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* 67: 112-115.
- Porter, W. M. 1979. The "Most Probable Number" Method for Enumerating Infective propagules of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Soil. *Australian Journal of Soil Research* 17: 515-519.
- Quiroz-Ayala, A. M. 2006. *Restauración de sistemas tropicales deteriorados con especies pioneras derivados de una selva tropical húmeda: La influencia de las micorrizas arbusculares*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Restauración ecológica). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 81 pp.
- Ramírez-Gerardo, M., Álvarez-Sánchez, J., Guadarrama-Chávez, P. y Sánchez-Gallen, I. 1997. Estudio de hongos micorrizógenos arbusculares bajo árboles remanentes en un pastizal tropical. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 61: 15-20.
- Ramos-Zapata, J., Guadarrama-Chávez, P. y Navarro, J. 2008. Estimación del número de propágulos infectivos de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). En: Álvarez-Sánchez, J y A. Monroy-Ata (Eds.). *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. pp. 17-27.
- Rashid, A., Ahmed, T. Ayub, N. y Khan, A. G. 1997. Effect of forest fire on number, viability of arbuscular mycorrhizae. *Mycorrhiza* 7: 217-220.
- Redecker, D. 2008. Glomeromycota. Arbuscular mycorrhizal fungi and their relative (s). Version 14 January 2008. <http://tolweb.org/Glomeromycota/28715/2008.01.14> in the Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Requena, N., Jeffries, P y Barea, J. M. 1996. Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 842-847.
- Richter, B. S., Tiller, R. L. y Stutz, J. C. 2002. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal propagules and colonization from abandoned agricultural fields and semi-arid grasslands in riparian floodplains. *Applied Soil Ecology* 20: 227-238.

- Rico-Gray, A., Beltrán, J. P. A., Álvarez, A. D. y Flores, E. D. 2005. Diversidad de arañas (Aracnida: Araneae) en el Parque Nacional Natural Isla Gorgona, Pacífico Colombiano. *Biota-neotropica* 5: 1-12.
- Rillig, M. C. y Mummey, D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171: 41-53.
- Rosendahl, S. 2007. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 178: 253–266.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Editorial Limusa, México. 431 pp.
- Sanchez, P. A. 1989. Soils. En: Lieth, H. y M. Werger (Eds.). *Ecosystems of the world; Tropical rain forest ecosystems*. Vol. 14B. Elsevier, Nueva York, EU. pp. 73-87.
- Sánchez-Gallen, I. y Álvarez-Sánchez, J. 1996. Root productivity in a lowland tropical rain forest in Mexico. *Vegetatio* 123: 109-115.
- 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 Guadarrama, P. 2000. Influencia de la micorriza arbuscular en el crecimiento de plántulas de la selva húmeda tropical de Los Tuxtlas, Veracruz. En: Alarcón, A. y R. Ferrera-Cerrato (Eds.). *Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. IRENAT-Colegio de Postgraduados: Montecillo. Mundi Prensa, México. pp. 69-77.
- Sánchez-Gallen, I. y Guadarrama, P. 2003. El papel de las asociaciones micorrízicas en el crecimiento y la competencia de plántulas. En: Álvarez-Sánchez, J. y E. Naranjo-García (Eds.). *Ecología del suelo en la selva tropical húmeda de México*. Instituto de Ecología, A. C., Veracruz, México. pp. 286-302.
- Sanders, F. E. y Sheik, N. A. 1983. The development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in plant root systems. *Plant and Soil* 71: 223-246.
- Sano, S. M., Abbott, L. K. y Solaiman, M. Z. 2002. Influence of living, inoculum level and inoculum placement on root colonization of subterranean clover. *Mycorrhiza* 12: 285-290.
- Santos, T. y Tellería, J. L. 2006. Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies. *Ecosistemas* 2: 3-12.
- Saunders, D. A., Hobbs, R. J. y Margules, C. R. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5: 18-32.
- Scariot, A. 1999. Forest fragmentation effects on palm diversity in central Amazonia. *Journal of Ecology* 87: 66-76.

- Schenck, N.C. y Pérez, Y. 1990. *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*, tercera edición. Synergistic Publications, Gainesville, Florida, EU. 241 pp.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. y Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Sieverding, E. 1991. *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agroecosystems*. Technical Cooperation Federal Republic of Germany, Eschborn. 371 pp.
- Simberloff, D. y Abele, L. G. 1982. Refuge design and island biogeographic theory: effects of fragmentation. *American Naturalist* 120: 41-50.
- Smith, S. E. y Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Londres, UK. 605 pp.
- Sommer-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 E. Naranjo-Suárez, (Eds.). *Ecología del suelo en la selva tropical húmeda de México*. Instituto de Ecología, A.C., Veracruz, 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.
- Souza, R. G., Maia, L. C., Sales, M. F. y Trufem, S. F. B. 2003. Diversidad e potencial de infectividad de hongos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, na Regia de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Brasil Botânica* 26: 49-60.
- Staddon, P. L., Heinemeyer, A. y Fitter, A. H. 2002. Mycorrhizas and global environmental change: research at different scales. *Plant and Soil* 244: 253-261.
- StatSoft Inc. 2000. STATISTICA for Windows (programa de cómputo manual). Statsoft, Inc., Tulsa, OK.
- Sylvia, D. M. y Jarstfer, A. G. 1992. Shared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Environmental Microbiology* 58: 229-232.
- Tester, M., Smith, S. E., Smith, F. A. y Walker, N. A. 1986. Effects of photon irradiance on the growth of shoots and roots, on the rate of initiation of mycorrhizal infection and on the growth of infection units in *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist* 103: 375-390.
- Tovar-Franco, J. 2006. Selección en invernadero de inóculos de micorriza arbuscular (MA) para el establecimiento de la alfalfa en un andosol de la sabana de Bogotá. *Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias* 2: 87-103.
- Turner, I. M. 1996. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology* 33: 200-209.

- van der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P, Streitwolf-Engel R., Boller, T., Wiemken, A. y Sanders, I.R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- van der Heijden, M.G.A. y Sanders, I.R. 2002. *Mycorrhizal ecology*. Heidelberg: Springer-Verlag. Berlin, Alemania. 471 pp.
- van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D. y van Straalen, N. M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11: 296–310.
- Varela, L., Estrada, A., Álvarez-Sánchez, J. y Sánchez-Gallen, I. 2008. *Catálogo ilustrado de hongos micorrizógenos arbusculares de la Reserva de la Biósfera de Los Tuxtlas*. Edición digital. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Villegas, J. y Fortin, J. A. 2001. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NH₄⁺ as nitrogen source. *Canadian Journal of Botany* 79: 865–870.
- Walker, N. A. y Smith, S. E. 1984. The quantitative study of mycorrhizal infection. II. The relation of rate of infection and speed of fungal growth to propagule density, the mean length of the infection unit and the limiting value of the fraction of the root infected. *New Phytologist* 96: 55-69.
- Wilcove, D. S., McLellan, C. H. y Dobson, A. P. 1986. Habitat fragmentation in the temperate zone. En: Soulé, M. E. (Ed.). *Conservation Biology: The science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EU. pp. 273- 256.
- Williams-Linera, G., Domínguez-Gaastelú, V. y García-Zurita, E. 1998. Microenvironmental and floristics of different edges in a fragmented tropical rainforest. *Conservation Biology* 12: 1091-1102.
- Wiseman, E. y Wells, C. 2005 Soil inoculum potencial and arbuscular mycorrhizal colonizations of *Acer rubrum* in forested and developed landscapes. *Journal of arboriculture* 31: 296-302.
- Wright, S. F. y Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198: 97-107.
- Zangaro, W., Bononi, V. L. R. y Trufen, S. B. 2000. Mycorrhizal dependency, inoculum potencial 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, New Jersey, EU. 662 pp.

Zhang, Y., Guo, L. D. y Liu, R. J. 2004. Survey of arbuscular mycorrhizal fungi in deforested and natural forest land in the subtropical region of Dujiangyan, southwest China. *Plant and Soil* 261: 257-263.

Apéndice 1. Técnica del número más probable (Porter, 1979)

Antes de la inoculación es necesario contar con un sustrato estéril, en este caso se utilizó arena esterilizada en autoclave durante una hora a 120°C por dos días consecutivos y secada a temperatura ambiente. El suelo del sitio de estudio fue previamente tamizado con un tamiz de apertura de malla de 5 mm, para eliminar los fragmentos y agregados mayores a la abertura de la malla. Se utilizó sorgo (*Shorgum. vulgare L.*) como planta trampa.

1. Se lavaron las semillas de sorgo con agua corriente y fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos. Por último, se preparó una solución de captan al 2%, que se esparció sobre las semillas.

2. Una vez desinfectadas, se colocan en cajas de plástico con una mezcla de agrolita y vermiculita estéril como sustrato para germinar durante una semana.

3. La preparación del suelo de cada sitio de estudio para 9 diluciones con 5 réplicas cada una se hizo de la siguiente manera:

4⁰: suelo sin diluir

4¹: 250 g de arena estéril más 75 g del suelo a evaluar

4²: 250 g de arena estéril más 75 g de suelo de la dilución 4¹

4³: 250 g de arena estéril más 75 g de suelo de la dilución 4²

4⁴: 250 g de arena estéril más 75 g de suelo de la dilución 4³

4⁵: 250 g de arena estéril más 75 g de suelo de la dilución 4⁴

4⁶: 250 g de arena estéril más 75 g de suelo de la dilución 4⁵

4⁷: 250 g de arena estéril más 75 g de suelo de la dilución 4⁶

4⁸: 250 g de arena estéril más 75 g de suelo de la dilución 4⁷

4⁹: 250 g de arena estéril más 75 g de suelo de la dilución 4⁸

4. En vasos de unicel de 300 g colocar 200 g de arena estéril, posteriormente 50 g de dilución realizada y por último 50 g de arena para cubrir el suelo a evaluar. Este procedimiento se realizó para cada réplica y dilución.

5. Después de una semana de germinación, se seleccionaron las plántulas del tamaño más uniforme y se sembraron dos en cada vaso, en caso de que alguna no sobreviviera. Es importante asegurar que la radícula esté en contacto con el suelo a evaluar.

6. Posteriormente se cubrieron las macetas con una malla delgada que permitió la entrada de luz pero impedía la posible contaminación de las macetas.

7. Se regaron las plántulas, cada tercer día, durante siete semanas; y sólo al momento del montaje se regaron con una solución nutritiva (Solución de Hoagland) baja en fósforo.

8. Después de este tiempo, se cosecharon las plantas, cuidando de separar las raíces de la planta que estuviera en contacto con el suelo a evaluar. Se colocaron en rejillas histológicas y se tiñeron con el método de Phillips y Hayman (1970) que más adelante se describe.

9. Finalmente, se montaron segmentos de raíces de 2 cm de largo, en un portaobjetos y se fijaron con alcohol polivinílico, se hicieron tantas preparaciones como plantas se tuvieron.

10. Cada preparación se observó al microscopio con el fin de detectar presencia o ausencia de colonización, indicando número de réplica y dilución.

11. El número de propágulos infectivos se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Log de } (\lambda) = (x) (\log a) - K$$

Donde:

Log (λ) = número de propágulos infectivos

x = número total de macetas con infección / número de réplicas por dilución

a = factor de dilución, 4;

K = constante de 0.201 para la dilución 4X obtenida de la tabla de Fisher y Yates (1970)

12. Para calcular los límites de confianza se usó la siguiente fórmula:

$$\log \lambda \pm (\hat{s}_\lambda / \sqrt{n}) (z)$$

Donde:

λ = número de organismos infectivos,

$\hat{s}_\lambda = 0.201$ para la dilución por cinco réplicas,

n = número de repeticiones por dilución y

z = 1.645 (valor tabulado para una probabilidad dada de 95%)

Solución de Hoagland

La solución nutritiva de Hoagland se preparó en 10 litros de agua destilada con las siguientes sustancias y sus respectivas cantidades:

Sustancia	Cantidad para 1 litro	Cantidad para 10 litros
KNO₃	1.02 g/l	10.20 g/l
Ca(NO₃), 4H₂O	0.492 g/l	4.92 g/l
NH₄H₂ (PO₄)	1 mg/l	10 mg/l
MgSO₄, 7H₂O	0.49 g/l	4.9 g/l
H₃BO₃	2.86 mg/l	28.60 mg/l
MnCl₂, 2H₂O	1.81 mg/l	18.10 mg/l
CuSO₄, 5H₂O	0.08 mg/l	0.80 mg/l
ZnSO₄, 5H₂O	0.22 mg/l	2.20 mg/l
Na₂MoO₄, 2 H₂O	0.09 mg/l	0.90 mg/l
FeSO₄,7H₂O 0.5%	0.6 mL	6.0 mL

En una solución nutritiva Hoagland normal, es decir para promover el crecimiento de plantas, se agrega una cantidad de 0.23 g/l de **NH₄H₂ (PO₄)**. Sin embargo, en este experimento, la cantidad de **NH₄H₂ (PO₄)** fue modificada para que se tuviera a una concentración de una parte por millón.

Apéndice 2. Tamizado húmedo, decantación y gradientes de densidad (modificado de Brundett *et al.*, 1996)

1. En un recipiente de aproximadamente un litro, se colocó el 50g de suelo seco de cada muestra compuesta y se lavó con agua amasando el suelo hasta reducir los grumos presentes lo más posible.

2. Nuevamente, el suelo fue lavado repetidamente con agua a través de dos tamices, el superior con una apertura de malla de 1 mm y el inferior de 40 μm , para eliminar los agregados mayores a éstas.

3. El suelo que quedo en el tamiz de 40 μm , se mezcló con agua destilada para realizar la primera centrifugación a 3500 rpm durante 4.25 min. Con esto se logra remover la materia orgánica que quedó flotando en el sobrenadante.

4. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en solución de glucosa al 40% para ser centrifugada durante 55 seg a 3 500 rpm y separar las esporas de las partículas del suelo más densas. El sobrenadante se retuvo en un tamiz de 40 μm y fue lavado repetidamente con agua destilada para eliminar la glucosa. En esta etapa se obtuvieron partículas de suelo y esporas de HMA.

5. Las esporas de HMA que presentaron contenido fueron separadas y contabilizadas por morfoespecies bajo un microscopio óptico. Una vez separadas, se lavaron en una solución de Tween 80 (detergente) durante un minuto y después en una solución de cloro al 5% para eliminar la materia orgánica. Por último, las esporas fueron montadas en portaobjetos con PVLG (alcohol polivinílico, agua, ácido láctico y glicerina).

Apéndice 3. Técnica de tinción de raíces (Phillips y Hayman, 1970)

1. Lavar las raíces con agua corriente.

2. Colocar las raíces en celdas histológicas.

3. Introducir las raíces en hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta que las raíces tomen una consistencia flexible y se tornen claras.

4. Si las raíces presentan suberización o taninos (coloración café-rojiza), agregar agua oxigenada (H_2O_2) al 3% por 10 minutos y lavar con agua corriente.

5. Agregar ácido clorhídrico (HCl) al 10% durante 5 minutos, eliminar el exceso pero no lavar con agua.

6. Colocar las raíces en una solución de azul de tripano al 0.05% con lactoglicerol (agua: glicerina: ácido láctico, 1:2:1) y dejarlas reposar ahí durante 24 horas, para después cambiarlas a una solución de lactoglicerol, donde se almacenan hasta su montaje.

Apéndice 4. Técnica de colonización micorrízica (Mc Gonigle *et al.*, 1990)

1. En cada portaobjetos se colocaron 30 segmentos de raíz de aproximadamente 2 cm de largo.

2. Se observaron al microscopio 90 campos con el objetivo de 20X y en ocasiones con el de 40X sólo para tener un mayor acercamiento y distinguir mejor las estructuras fúngicas. La selección de los campos se hizo trazando líneas virtuales, a lo largo del portaobjetos, paralelas y separadas entre sí por 0.5 cm. De esta forma, cada interfecto de raíz x línea es considerado un campo a registrar.

3. Por campo, se anotó la estructura fúngica hallada, o si no se encontró nada, además del total de campos observados.

4. Se procedió a estimar los porcentajes de colonización total y por estructuras (sólo para la dilución “0”) con las siguientes fórmulas:

$$PCTd = \frac{No.Sc}{No.Sto} (100)$$

Sólo para la dilución “0”

$$PCTe = \frac{No.Sef}{No.Sto} (100)$$

En donde:

Sc = No. de segmentos colonizados

Sef = No. de segmentos con estructura fúngica

Sto = No. de segmentos totales observados

5. El total de campos visualizados correspondió al 100% de campos y el número total de campos con alguna estructura fúngica relativo al total observado correspondió al porcentaje total de colonización; mientras que si se consideraron las estructuras presentes, el número de campos por estructura en función del total de campos observados permitió calcular el porcentaje de colonización por estructura.