



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estimación del potencial de inóculo de hongos micorrizógenos
arbusculares en cuatro diferentes usos de suelo en Los Tuxtlas,
Veracruz, México**

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:

IRMA CERVANTES SALGADO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRENE SÁNCHEZ GALLEN

2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Cervantes
Salgado
Irma
59 15 38 21
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308262896

2. Datos del tutor

Dra.
Irene
Sánchez
Gallen

3. Datos del sinodal 1

Dr.
José Alberto
Ramos
Zapata

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María del pilar
Ortega
Larrocea

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Sara Lucía
Camargo
Ricalde

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Rosalba
García
Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

Estimación del potencial de inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares en cuatro diferentes usos de suelo en Los Tuxtlas, Veracruz, México.

78p
2017

A mis padres

A mi hijo Sinuhé Jesús

A Alberto

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PAPIIT IN116874, “Almacenes de carbono en el suelo de una selva húmeda: la contribución de los hongos micorrizógenos arbusculares”, por la beca otorgada, la cual me permitió sacar adelante este trabajo de investigación y por los recursos para las salidas de campo y procesamiento de muestras.

Agradezco a cada uno de los profesores del laboratorio Ecología del Suelo: Javier Álvarez, Guadalupe Barajas y Juan Carlos Peña, por sus aportaciones y comentarios acertados que permitieron el enriquecimiento de este trabajo.

Agradezco de manera especial a mi asesora Irene Sánchez Gallen, que gracias a las pláticas y comentarios hicieron posible la realización de esta tesis. También le agradezco por las pláticas que no fueron precisamente acerca del trabajo, pero que también han contribuido en mi formación personal.

Agradezco a al Dr. José Ramos, a la Dra. Pilar ortega, a la Dra. Sara Lucía Camargo y a la Dra. Rosalva García, por haber aceptado revisar mi trabajo escrito, así como por las contribuciones al mismo.

Agradezco a H. Alberto Mendoza Arenas y Carlos A. González Franco por su apoyo en el montaje del experimento en invernadero.

A Juan Carlos Peña Becerril por el apoyo y sus aportaciones.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología del Suelo: Irvin Mendoza Hernández, Laura Gabriela Santiago Gómez, Isaac Romeo Acevedo Rojas, Manuel Casariego Martínez, Juan Carlos Peña Becerril, Alejandro Abel Becerril Pombo, Viviana, América, Sally, Chezz, Carlos, por su participación en los muestreos y con los que compartí horas de trabajo, charlas a la hora de la comida y momentos muy agradables que hacían ameno el trabajo escrito.

Al Dr. José Ramos Zapata por ayudarme a analizar mis datos con el programa Dilution.

Al Biól. Marco Antonio Romero Romero por el apoyo en el uso del equipo de cómputo.

A la M. en C. Patricia Olgún por el apoyo en el uso del invernadero.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis papás, por el regalo de la vida, y por los felices momentos que he pasado a su lado. Gracias por la motivación, por confiar y creer en mí, por el apoyo que me han brindado y que me siguen dando, por sus sabios consejos que, en ocasiones, no valoré y por alentarme a superarme. Juntos empezamos este camino y sin ustedes nada de esto sería posible, es por eso que juntos concluimos una meta más de este camino que aún falta por recorrer. Gracias por ser mis maestros.

A mi hijo Sinuhé: mi gran amor, a ti te agradezco la felicidad que invade mi corazón, eres mi inspiración, mi alegría, la razón de mí ser, gracias por ser tal como eres, no cambiaría ni una parte de ti, a pesar de los berrinches. Todos los días pones a prueba mi paciencia y me haces ver que aún me falta mucho por aprender. Te amo.

A H. Alberto, mi amor, mi compañero de vida, gracias por sumarte a este viaje que, aunque se prolongó, has estado a mi lado apoyándome.

A mis hermanas Ana y Leti y a mis sobrinas Paola y Regina, a las que quiero mucho.

A mi gran amiga Yeimi, mi incondicional, mi consejera, que ha estado conmigo desde el inicio de la carrera, hemos pasado grandes momentos y agradezco por animarme a no darme por vencida y seguir adelante.

A Maru, por haber sido mi tutora de Beca desde el inicio de la carrera, gracias por escucharme cuando lo necesitaba, por consentirme durante el embarazo y por apreciarme de esa forma especial.

¡Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por abrirme sus puertas, y mostrarme el mundo de la biología!

ÍNDICE

1.	Introducción.....	5
1.1.	Los hongos micorrizógenos arbusculares.....	8
1.1.1.	Propágulos infectivos y potencial de inóculo.....	9
1.2.	Factores que modifican el potencial de inóculo.....	11
1.2.1.	Luz.....	12
1.2.2.	Temperatura.....	12
1.2.3.	pH.....	13
1.2.4.	Nutrientes.....	13
1.2.5.	Vegetación.....	14
1.2.6.	Estacionalidad.....	15
1.2.7.	Disturbio.....	15
1.3.	Método para estimar el potencial de inóculo.....	17
2.	Antecedentes.....	19
2.1.	Cambio de uso de suelo.....	20
2.2.	Uso de suelo.....	21
2.3.	Potencial de inóculo en Los Tuxtlas.....	24
3.	Objetivo general.....	25
4.	Hipótesis.....	25
5.	Método.....	26
5.1.	Zona de estudio.....	26
5.2.	Clima.....	26
5.3.	Vegetación.....	26
5.3.1.	Bosque tropical perennifolio primario.....	28
5.3.2.	Bosque tropical secundario.....	28
5.3.3.	Potrero.....	29
5.3.4.	Cultivo.....	29
5.3.5.	Cambio de uso de suelo.....	30
5.4.	Muestreo en campo.....	30
5.5.	Estimación del potencial de inóculo.....	31
5.5.1.	Trabajo en invernadero.....	31
5.5.2.	Tinción de raíces.....	34

5.5.3.	Porcentaje de colonización.....	34
5.5.4.	Proporción de la colonización de las diluciones.....	35
5.6.	Análisis de datos	35
5.6.1.	Porcentaje de colonización micorrícica.....	35
5.6.2.	Número de propágulos infectivos	36
5.6.3.	Estimación del NMP de HMA con el programa Dilution	37
5.6.4.	Proporción de la colonización de las diluciones	38
6.	Resultados	38
6.1.	Porcentaje de colonización total.....	38
6.2.	Porcentaje de colonización por estructuras.....	40
6.3.	Potencial de inóculo	44
6.3.1.	Número de propágulos	44
6.3.2.	Estimación del NMP con el programa Dilution	45
6.3.2.1.	NMP en lluvias por cada uso de suelo.....	45
6.3.2.2.	NMP en secas por cada uso de suelo	45
6.4.	Proporciones de la colonización en las diluciones	47
6.4.1.	Temporada de lluvias	47
6.4.2.	Temporada de sequía.....	47
7.	Discusión.....	49
7.1.	Porcentaje de colonización	49
7.1.1.	Temporada	49
7.1.2.	Porcentaje de colonización por uso de suelo	50
7.2.	Potencial de inóculo	52
7.3.	El método	54
7.4.	Probabilidad de colonización por diluciones.....	54
8.	Conclusiones.....	55
9.	Literatura citada	56
	Apéndice 1	66
	Apéndice 2.	68
	Apéndice 3	70
	Apéndice 4	71

Resumen

Uno de los problemas que enfrenta la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas, Veracruz, es la deforestación y fragmentación por actividades antropogénicas (principalmente por ganadería y agricultura), dada la complementariedad funcional entre las especies vegetales y los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), es de esperarse que mientras más alterado sea el ambiente, mayor será la selección de especies de HMA que puedan tolerar condiciones estresantes y como consecuencia la riqueza disminuirá, lo que se verá reflejado en su funcionalidad.

El potencial de inóculo es una medida de dicha funcionalidad, y se evalúa a través del número de propágulos (esporas, raíces colonizadas y micelio). Éste puede ser afectado por el manejo de los suelos (prácticas agrícolas, mineras y de pastoreo), modificando los factores que pueden afectar el establecimiento de plantas y, a su vez, de los HMA.

Por ello, el objetivo de este estudio fue estimar el potencial de inóculo de HMA en cuatro usos de suelo (bosque tropical perennifolio primario y secundario, potrero y cultivo), en Los Tuxtlas, Veracruz, para secas y lluvias. Se espera que conforme aumenta el número de propágulos en el suelo, el nivel de colonización en las raíces también aumente.

Para evaluar el potencial de inóculo de HMA, se estimó el número de propágulos colonizadores y su porcentaje de colonización, en los cuatro usos de suelo, en dos estaciones climáticas: lluvias (agosto) y sequía (abril), de 2015. Para ello, se colectó suelo de 25 sitios por cada uso de suelo (4); en total 100 puntos muestreados. Se aplicó el método del número más probable (NMP) y se determinó el porcentaje de colonización micorrícica usando sorgo (*Sorghum vulgare* L.) como planta trampa, y suelo original de cada sitio, más nueve diluciones. El NMP se estimó con el programa Dilution.

En promedio, se obtuvo un mayor número de propágulos en la temporada de lluvias ($13\ 593 \pm 10\ 986$) que en sequía ($7\ 228 \pm 5\ 088$). Los valores más contrastantes fueron entre potrero y cultivo. El potrero tuvo el mayor número de propágulos, en ambas temporadas, 46 435 en 50 g de suelo en lluvias, y 21

912 en sequía; y el cultivo, tuvo el menor número de propágulos, 95 en lluvias y 17 en sequía. Asimismo, los factores temporalidad y uso de suelo, produjeron diferencias significativas en el porcentaje de colonización total, siendo mayor en temporada de sequía (16.2 ± 1.4) y en potrero (24.59 ± 3.50).

El impacto de las técnicas agrícolas es negativo sobre la funcionalidad de los HMA, generando una disminución en el número de propágulos afectando la relación con las plantas; sin embargo, lo contrario ocurrió con los potreros que tienen el mayor número de propágulos, lo que puede explicarse por los bajos insumos utilizados para su mantenimiento y, por lo mismo, tienden a ser un reservorio de HMA; aunque, es necesario explorar si la estructura y composición de la comunidad de estos hongos es diferente entre usos de suelo y temporada y, a su vez, ligarlas con el NMP; relacionando la capacidad de cada especie de HMA, para establecer la asociación con las raíces de las plantas y así explicar la cantidad de propágulos en determinado suelo y temporada.

1. Introducción

La micorriza arbuscular (MA) es una asociación mutualista endosimbiótica, en la que participan los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) del Phylum Glomeromycota y las raíces de un gran número de plantas (Smith y Read 1997); la evidencia fósil sugiere que es una de las asociaciones planta-hongo más antigua, ya que se tienen registros de su presencia en los rizomas de las primeras plantas que colonizaron el medio terrestre hace más de 400 millones de años (Remy *et al.* 1994).

La MA se encuentra en muchos ecosistemas terrestres como desiertos, dunas de arena, selvas, salinos y sistemas manejados como praderas, huertos y cultivos agrícolas; además de encontrarse con mayor frecuencia en vegetación de bajas latitudes, y en suelos con características particulares como suelos pobres en nutrientes, también se ha encontrado con un pico de mayor colonización de HMA en raíces en suelos moderadamente fértiles con una relación de C/N=11.8, así como una disminución a lo largo de un gradiente de relaciones C/N superiores e inferiores a 11.8 baja (Janos 1980a, Brundrett 1991, Read 1991, Soudzilovskaia *et al.* 2015).

La relación mutualista entre plantas y HMA es muy común; aproximadamente entre el 80% y 95% de las especies vegetales terrestres la presentan (briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas) (Das y Varma 2009, Oehl *et al.* 2011).

Los HMA son hongos que pertenecen al Phylum Glomeromycota, y recientemente clasificado dentro del Phylum Mucoromycycota (Spatafora *et al.* 2016) que cuenta con aproximadamente 29 géneros y 230 especies descritos. De los 29 géneros, 28 se asocian con especies vegetales; sólo *Geosiphon* se asocia con cianobacterias y no forma la micorriza arbuscular (MA) (Das y Varma 2009, Oehl *et al.* 2011).

El micotrofismo en las plantas puede ser dependiente o facultativo; lo primero se refiere a que las plantas no pueden crecer en ausencia de HMA, bajo determinados niveles de P disponible; y las facultativas son aquéllas que tienen

la capacidad de alcanzar la etapa de madurez reproductiva sin HMA en hábitats fértiles, o aquéllas que dejan de ser dependientes cuando han alcanzado la etapa de madurez, debido a que sus requerimientos minerales tienden a disminuir, al igual que las tasas de crecimiento, fotosíntesis, y respiración; mientras que otras plantas facultativas pueden desarrollarse en presencia o ausencia de HMA, incluso algunas pueden hacerlo en suelos con bajos niveles de fósforo (Janos 1980b, Janos 2007, Brundrett 2004).

El término MA hace referencia a los arbuscúlos, los cuales son hifas que se ramifican dentro de las células de la raíz de la planta hospedera hasta formar estructuras parecidas a arbustos, cuya función es el intercambio de nutrientes, carbono y agua, entre planta y hongo; se caracterizan por tener una corta vida, ya que empiezan una lenta senescencia después de cuatro días de haberse formado (Siddiqui y Pichtel 2008, Das y Varma 2009). Sin embargo, no es la única estructura que se ha descrito que desarrollan estos hongos dentro de la raíz, también podemos encontrar vesículas y esporas, además de las hifas.

Las vesículas se forman por el hinchamiento de la hifa, entre y dentro de las células corticales como estructuras de almacenamiento de fosfolípidos. Se ha observado que no en todos los géneros se presentan (Johnson *et al.* 1999) y que únicamente la presencia de vesículas intrarradicales puede aumentar el potencial de inóculo en algunas especies de HMA como *Glomus fasciculatum*, *Glomus mosseae* y *Acaulospora spinosa* (Biermann y Linderman 1983).

Las esporas son estructuras de reserva lipídica y de carbohidratos para la germinación y crecimiento de la hifa; en caso de encontrarse sin contenido citoplasmático, se consideran propágulos no viables. Tienen paredes gruesas de quitina por lo que se consideran estructuras de dispersión y tolerantes al estrés, son importantes para iniciar la colonización en sitios sin HMA o ambientes variables (Cuenca 2015).

La red hifal o micelio extrarradical es otro de los componentes de la micorriza arbuscular también muy importante, debido a que es el medio por el cual se absorben y transportan los nutrientes hacia la planta. Puede ser muy extenso, más de 100 m de hifas/cm³ de suelo y cuando llegan a unirse hifas de la misma

especie, forman una red funcional que interconecta a las plantas de la misma o de diferente especie (Jeffries y Barea 2012).

Los HMA, al iniciar la colonización de la raíz, forman una estructura conocida como apresorio o hifopodio que ejerce una fuerza mecánica rompiendo la epidermis de la raíz y permitiendo que el micelio penetre y se extienda entre y dentro de las células corticales para, posteriormente, desarrollar los arbusculos, las vesículas y las esporas (Genre y Bonfante 2012).

El desarrollo de la asociación puede durar entre semanas y meses, y tiende a ser más lento cuando la colonización es a partir de esporas que de raíces ya colonizadas o micelio, debido a que para colonizar cualquier raíz, las esporas deben germinar, desarrollar micelio y colonizar la raíz, lo que requiere de una inversión de energía y de mayor tiempo que en el caso del micelio extrarradical (Abbott y Robson 1981); por lo mismo, se ha considerado que las esporas no son el inóculo más eficiente para la formación de micorrizas (Read *et al.* 1976, Klironomos y Hart 2002), excepto cuando se habla de ambientes perturbados como pastizales, dado que en estos sitios se han encontrado altas densidades de esporas (Jasper *et al.* 1991, Guadarrama *et al.* 2014); aunque, algo muy importante a considerar es que pueden mantenerse latentes por un largo periodo de tiempo en el suelo hasta que las condiciones sean las óptimas para su germinación, a diferencia del micelio y los trozos de raíces colonizadas que si no están en contacto con una fuente de carbohidratos, pierden su eficacia, perecen y no pueden ser considerados como propágulos.

La MA se caracteriza por el intercambio bidireccional de nutrientes planta-hongo, donde ambos resultan beneficiados. Entre el 4% y 20% de los carbohidratos producidos en la fotosíntesis son transferidos de la planta al hongo (Smith y Read 1997, Janos 2007); en retribución, la planta aumenta de 10 a 1 000 veces su área de absorción a través del micelio, asegurando la captación de agua y nutrientes minerales del suelo como fosfatos y otros nutrientes, a los que de otra forma no podría acceder (Das y Varma 2009). En resumen, esta asociación resulta de la interacción de tres factores: planta, HMA y suelo (Brundrett 1991, McGonigle y Miller 2000), por ello su entendimiento y

manejo resulta ser mucho más complejo de lo que se esperaría de una relación mutualista.

1.1. Los hongos micorrizógenos arbusculares

Los HMA son simbioses obligados; es decir, no son capaces de desarrollarse sin la planta hospedera (Bonfante y Genre 2010). Los HMA confieren beneficios a las plantas hospederas tales como mayor crecimiento y supervivencia, una recuperación más rápida de las plantas cuando han sido depredadas y en leguminosas pueden aumentar el tamaño de los nódulos de las bacterias (Janos 1980b).

Cuando la planta se encuentran en suelos pobres en nutrientes y/o en condiciones poco favorables, su desarrollo se ve restringido, es por ello que al asociarse las raíces de la planta con los HMA, permiten que sea mas eficiente la absorción del nitrógeno y el fósforo inorgánico por la planta (Smith y Read 1997, Zangaro *et al.* 2000, Padilla *et al.* 2004). Por lo que se espera que aquellas plantas que se encuentren colonizadas por los HMA tengan ventaja en hábitats sensibles al estrés hídrico o con deficiencia de fósforo o algún otro nutriente, sobre las plantas no colonizadas por HMA (Janos 1980b).

Además de proteger a la planta hospedera contra el estrés abiótico (falta de agua o nutrientes), los HMA pueden tener muchos beneficios y aplicaciones al asociarse con la planta; por ejemplo, pueden contribuir a mejorar la estructura del suelo, pueden funcionar como barreras contra los metales pesados y el exceso de sales; además, por su contribución en la captura de nutrientes, con ellos se puede evitar el uso de fertilizantes químicos, sustituyéndolos por biofertilizantes, lo cual, a largo plazo, puede mantener la biodiversidad y funcionamiento de los ecosistemas naturales (Smith y Read 1997, Cuenca *et al.* 2003).

En el mismo sentido de los beneficios que se pueden obtener de los HMA, su uso en la agricultura ha demostrado que aquellos cultivos micorrizados pueden tener mayor ventaja sobre los sistemas agrícolas de altos insumos (Janos 2007), debido a que en el primer caso, se reduce el uso de pesticidas y, con ello, el alto impacto en la contaminación ambiental que es uno de los objetivos

de la agricultura sustentable (Jeffries y Barea 2012); además de que se ha sugerido que estas prácticas favorecen el control de malezas y plagas.

Algunos HMA también pueden proporcionar protección a su hospedero de la invasión por patógenos (Harrier y Watson 2004). El uso de inoculantes eficientes es de gran utilidad para la agricultura, horticultura y silvicultura sostenible (Siddiqui y Pichtel 2008); sin embargo, se recomienda el uso de inoculantes nativos (Zamarripa *et al.* 2013) en lugar de usar especies exóticas, una de las ventajas que ofrecen es que éstos se encuentran adaptados a las condiciones del sitio (Jeffries y Barea 2012). Por ejemplo, *Acaulospora laevis* y *Glomus* sp. colonizan y esporulan más en el suelo de origen que en otro (Porter *et al.* 1987).

1.1.1. Propágulos infectivos y potencial de inóculo

El medio por el cual los HMA establecen la relación mutualista con las plantas, es mediante propágulos colonizadores (*Fig. 1*), los cuales pueden ser hifas, arbuscúlos y vesículas que se encuentran dentro de las células corticales de las raíces de la planta (Abbott 1981), esporas latentes y micelio extrarradical activo en el suelo (Schalamuk y Cabello 2010).

La capacidad que tienen los propágulos del suelo para establecer la relación mutualista con las raíces de la planta en un sitio dado, se define como potencial de inóculo (Brundrett y Abbott 1995). Cuando esto sucede, el inóculo es considerado viable (Guadarrama 2008) o infectivo (Abbott y Robson 1981), ambos términos hacen referencia a que el inóculo es capaz de colonizar la raíz de la planta hospedera.

La formación de micorriza en una especie vegetal depende del número relativo de propágulos colonizadores, debido a que la colonización intrarradical es esencial para la permanencia de los HMA en el suelo (Abbott y Robson 1991). Diversos estudios señalan que un bajo porcentaje de colonización radical está relacionado con un bajo número de propágulos colonizadores (Padilla *et al.* 2004, Guadarrama 2008) y que conforme aumenta el número de éstos en el suelo, el porcentaje de colonización también tiende a incrementarse (Carling *et al.* 1979). Por ejemplo, Sieverding *et al.* (1991) considera que aquel suelo que

tenga la capacidad de producir alto porcentaje de colonización radical, será un suelo infectivo y, por lo tanto, será considerado como un suelo con alto potencial de inóculo.

Sin embargo, a pesar de que varios autores dan por hecho que un alto porcentaje de colonización es igual a mayor potencial de inóculo; es importante considerar la posibilidad de que no necesariamente se trata de una relación lineal ni mutualista, debido a que, en ocasiones, cuando la colonización es muy elevada puede ser que la asociación haya dejado de ser positiva para ambos miembros, convirtiéndose más bien en una relación parásito (hongo)-hospedero (planta); esto sucede cuando el costo sobrepasa los beneficios que pudiera tener la planta al asociarse con el HMA (Jonson *et al.* 1997).

La importancia de conocer y cuantificar el número de propágulos viables de un suelo está relacionado con sus usos potenciales en agricultura, horticultura, silvicultura, manejo de bosques y restauración de regiones degradadas (Korb *et al.* 2003, Siddiqui y Pichtel 2008). Además, poder cuantificar los propágulos de los HMA permite conocer acerca de los factores que influyen en su distribución, debido a que cualquier factor que produzca un cambio en el potencial de colonización de los propágulos de las diferentes especies de HMA, afecta el desarrollo de la MA (Abbott y Robson 1991).

El potencial de inóculo y la colonización radical varían dependiendo de la identidad especies de HMA y de las plantas hospederas, y del número de propágulos de HMA que haya en el suelo (Janos 1980a, Kiers *et al.* 2000, van der Heijden 2002). Lo que sugiere que la comunidad de HMA puede influir diferencialmente sobre la comunidad de plantas hospederas (Kiers *et al.* 2000). Al igual que las especies de HMA difieren en su capacidad de proliferar en el suelo debido a que se ven influenciadas por las especies vegetales (Johnson *et al.* 1991)

Por ejemplo, al inicio de la sucesión han encontrado que especies pioneras y de sucesión temprana son más susceptibles a la colonización, además de tener un alto potencial de inóculo, favoreciendo el crecimiento de las especies pioneras; mientras que especies vegetales de sucesión tardía o bosque tropical

primario son menos susceptibles a la colonización, donde el potencial de inóculo es bajo (Zangaro *et al.* 2000, Álvarez-Sánchez *et al.* 2009).

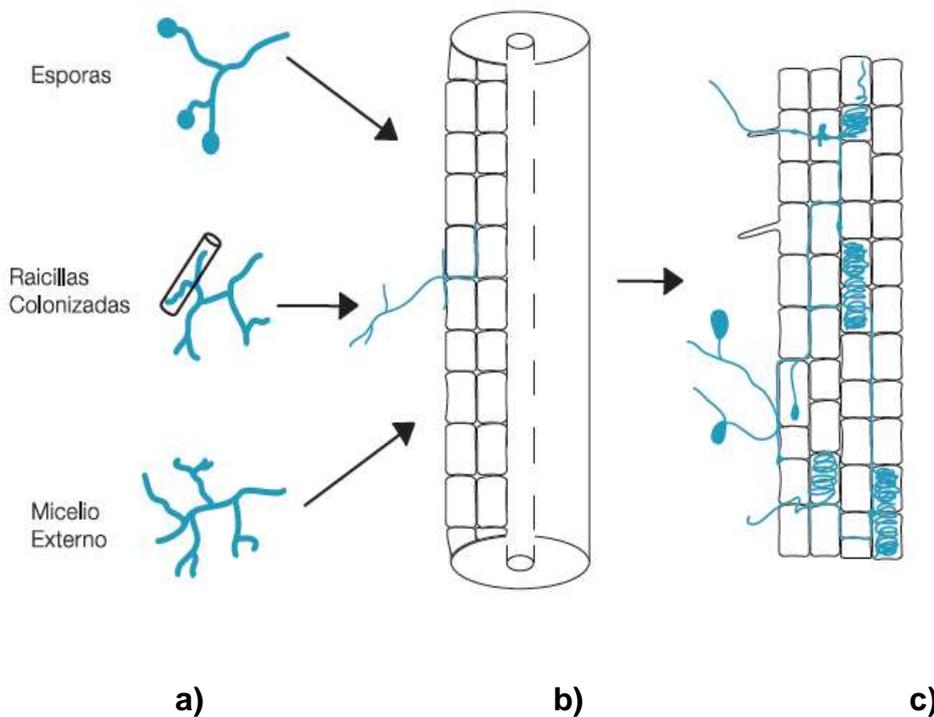


Figura 1. a) Propágulos de los HMA, esporas, raíces colonizadas y micelio externo. b) Establecimiento de los puntos de colonización dentro de la raíz. c) Formación de arbusculos y de micelio interno, para el posterior desarrollo del micelio externo (tomado de Cuenca 2015).

1.2. Factores que modifican el potencial de inóculo

Los factores que interfieren en el establecimiento de la interacción de los HMA, con las plantas, pueden subdividirse en dos tipos, abióticos y bióticos. Dentro de los abióticos están los factores edáficos como la concentración de recursos (nutrientes y agua) o de metales pesados; además de los climáticos (como luz y humedad ambiental) (Brundrett 1991, Ortega-Larrocea *et al.* 2007). Mientras que los bióticos van desde las propiedades de la raíz (diámetro, longitud, cantidad de pelos radicales) y de los organismos del suelo, hasta la compatibilidad hongo-hospedero, la fenología del hongo, la dependencia

micorrícica, el papel de las hifas en el suelo y el disturbio de éste (Brundrett 1991).

Al modificarse las características de un suelo, ya sea porque se elimina la cobertura vegetal o porque ocurre un cambio de uso de suelo, la densidad de propágulos depende de la inmigración de propágulos de áreas cercanas, así como de la supervivencia y propagación de aquéllos que quedaron después de la alteración (Korb 2003).

1.2.1. Luz

Cuando la planta se desarrolla en condiciones de poca luz o está bajo intensa defoliación crece poco; ello implica la reducción de la fotosíntesis y, a su vez, la reducción del carbono asignado a la raíz; lo cual se ha relacionado con menor esporulación, debido a que la planta no tiene suficientes carbohidratos para poder mantener la asociación con los hongos (Tester *et al.* 1986). Además, a mayor intensidad lumínica, aumenta la actividad fotosintética y, como consecuencia, la disponibilidad de los carbohidratos solubles en las raíces de la planta, promoviendo el desarrollo y respuesta de los HMA (Zangaro *et al.* 2000, Korb *et al.* 2003).

1.2.2. Temperatura

Todos los propágulos pueden ser afectados por la temperatura elevada; sin embargo, la red de hifas es la más afectada y posiblemente la que provoca una disminución en la densidad de los propágulos de HMA (Pattinson *et al.* 1999). Aunque existen excepciones como *Gigaspora calosporaspara*, especies que tiene la capacidad de germinar en suelos con altas temperaturas, mientras que especies de *Acaulospora lavis* y *Glomus caledonium* no tienen la capacidad de germinar a altas temperaturas y tienden a conservar las esporas como propágulos, para cuando la temperatura del suelo y el contenido de agua son los óptimos para su germinación (Tomerup 1983). También se ha reportado que el micelio extrarradical es más sensible a bajas temperaturas, que el micelio intrarradical, donde el micelio es incapaz de desarrollarse por debajo de

15°C mientras que la colonización intraradical se desarrollo a 5°C (Gavito *et al.* 2000).

1.2.3. pH

El pH puede ser un factor determinante en la distribución de las especies fúngicas, así como en la germinación de esporas y crecimiento de hifas. Por un lado, algunas son favorecidas por bajos valores de pH como es el caso de *A. laevis* y otras por pH altos como *Glomus* sp. Cuando el pH es muy ácido, también disminuye el número de esporas; de tal forma que si los propágulos son afectados o su número es reducido, finalmente, puede repercutir sobre el potencial de inóculo (Porter *et al.* 1987).

1.2.4. Nutrientes

Por otro lado, la disponibilidad de nutrientes modifica la asociación planta-hongo. Cuando la disponibilidad de nutrientes en el suelo es alta, la colonización radical se ve reducida, al igual que los propágulos (Guadarrama *et al.* 2014), debido a que la planta ya no tendría necesidad de traslocar una gran cantidad de carbohidratos hacia otro lado que no fueran sus propias raíces y establecer la asociación, partiendo de que por sí misma podría tomar los nutrientes del suelo por lo que el gasto energético que el hongo representa no tendría sentido (García *et al.* 2008); por el contrario, cuando la disponibilidad es baja, se fortalece la asociación micorrícica (Janos 1980b, Treseder y Allen 2002) porque, en este caso, la planta se encuentra necesitada de nutrientes que el HMA es capaz de proporcionarle; lo que indicaría la baja fertilidad del suelo (Zangaro *et al.* 2000).

Mientras que en suelos con muy bajas concentraciones de fósforo, la asociación micorrícica no es favorecida porque, finalmente, se rompe la bidireccionalidad de la interacción (Padilla *et al.* 2004); es decir, la planta proporciona los carbohidratos que el HMA requiere, pero éste no es capaz de transferir los nutrientes, al menos no el fósforo, porque su concentración es muy baja y no es capaz de obtenerlo a través de otros medios, como es el caso de los hongos ectomicorrizógenos que son capaces de degradar la materia orgánica.

La fertilización con fósforo a niveles más altos que los óptimos para el crecimiento de las plantas, elimina la formación de vesículas intrarradicales en raíces de pastos. Asimismo, la alta concentración de fósforo, metales pesados, ácidos orgánicos, algunos azúcares y sales, inhibe la germinación de las esporas (Cuenca 2015). Cuando el fósforo y el nitrógeno aumentan en el suelo, se reduce la esporulación, lo que sugiere una estrecha relación entre las propiedades químicas del suelo y la productividad de la planta, con los niveles de colonización (Johnson *et al.* 1991).

1.2.5. Vegetación

La densidad de propágulos está relacionada positivamente con la cobertura vegetal de gramíneas y riqueza de herbáceas, y negativamente con la cobertura de especies arbóreas de ambientes templados (Korb *et al.* 2003). Por lo mismo, cuando se retira la cubierta vegetal, la biota del suelo puede verse alterada, ya sea por cambios directos (más de índole biótica) o indirectos por alteraciones en las propiedades físicas y químicas del suelo.

Con respecto a las afectaciones directas, puede ocurrir que disminuya la densidad de propágulos, con lo cual el potencial de inóculo también se ve reducido y/o a que haya un cambio en la composición fúngica, de tal forma que las especies vegetales originales no sean colonizadas por sus hongos más afines. Por ejemplo, al deforestar un bosque de clima templado donde predominan las ectomicorrizas, para establecer parcelas de pastoreo o cultivos, no sólo cambia la vegetación original por herbáceas, sino que también se favorecerán asociaciones micorrícicas diferentes (micorriza arbuscular) a las que originalmente predominaban (Read 1991). Otro ejemplo es la variación estacional que genera un cambio en la composición vegetal, la cual también influye en la formación de micorrizas debido a diferencias en la infección entre especies de plantas (Abbott y Read 1991).

Asimismo, cuando la cobertura vegetal es eliminada, también se están eliminando especies de HMA, lo que trae como resultado que el número de propágulos de HMA tienda a disminuir (Guadarrama *et al.* 2014).

1.2.6. Estacionalidad

Una variable que tiene una escala de acción más global es la distribución de la precipitación a lo largo del año, ya que determina la existencia o no de una estacionalidad claramente definida; es decir, una temporada de secas y una de lluvias, que tiene una influencia sobre la fisiología de la planta hospedera y, por tanto, en la asociación micorrícica. Se ha reportado que en temporada de lluvias es cuando se encuentra la mayor colonización porque, en este momento, se incrementa la concentración de agua en el suelo y con ello los nutrientes disueltos en la solución nutritiva; así como el alto potencial hídrico que propicia la germinación de las esporas y, en consecuencia, se reduce su abundancia en el suelo (Miller *et al.* 1985, García *et al.* 2008).

Por otro lado, durante la temporada de secas se pueden encontrar más esporas (Guadarrama y Álvarez-Sánchez 1999) debido a que las plantas están sujetas a un estrés hídrico, lo que repercute en que los hongos que colonizan las raíces de las plantas, respondan produciendo esporas que, como ya mencioné, son estructuras de resistencia. Sin embargo, otros autores no reportan diferencias estacionales en la esporulación, pero si en cuanto al número de propágulos, siendo mayor en secas (Guadarrama *et al.* 2014).

1.2.7. Disturbio

Cualquier alteración ambiental que repercuta en el suelo produciendo cambios físicos, químicos y/o biológicos, puede traer consecuencias sobre el potencial de inóculo de los HMA, ya sea en ambientes naturales o modificados (Abbott 1991). En general, si el disturbio modifica la cubierta vegetal, ya sea reduciéndola, eliminándola o cambiando su composición, ocurre lo mencionado en el apartado anterior.

Pero, si además o en lugar de la remoción de la cobertura vegetal, ocurren alteraciones directas sobre el suelo ocasionadas por su manejo, la colonización de las raíces puede verse alterada, dado que se ha demostrado que en suelos con disturbio, hay menor colonización, a diferencia del suelo sin disturbio (Addy *et al.*, 1997), reflejando la inadecuación de los suelos perturbados para el establecimiento de las plantas, así como la pérdida de propágulos (Abbott y

Robson 1991). Sin embargo, no se puede generalizar, pues también se ha observado que con o sin disturbio, no hay diferencias en la colonización radical, manteniéndose altos porcentajes de colonización; esto puede deberse a que la colonización también depende de otras variables tales como la interacción de las condiciones ambientales, así como de los HMA y las plantas hospederas involucrados (McGonigle y Miller 2000).

Se ha observado que en suelos con prácticas agrícolas con uso excesivo de fertilizantes fosfóricos y pesticidas, se inhibe el establecimiento y la efectividad de la simbiosis micorrícica (Sieverding 1990, Kjölller y Rosendahl 2000). Además, se reduce la infectividad de los HMA al romper la red micelial, debido a que al momento de preparar la tierra, el micelio se fragmenta, convirtiéndolo en propágulo no infectivo o poco infectivo (Jasper *et al.* 1989b, Brundrett 1991).

En consecuencia, este tratamiento edáfico puede dificultar la translocación de los nutrientes (Jeffries y Barea 2012) como la absorción de P, que es más efectiva en suelos sin disturbio que en suelos con disturbio. El micelio fragmentado requiere de más tiempo para desarrollarse y colonizar una nueva raíz que el no fragmentado (Jasper 1989b, McGonigle y Miller 2000, Sangabriel-Conde *et al.* 2010).

Es importante considerar que un disturbio como el cambio de uso de suelo por actividades agrícolas y su posterior abandono, no necesariamente disminuyen el número de propágulos, sobre todo si existe un periodo de barbecho, ya que las especies pioneras son altamente micorrícicas, por lo que su presencia permite el mantenimiento de la estructura de la comunidad de los HMA, no necesariamente su composición, como es el caso de la práctica de tumba, roza y quema que tiene un bajo impacto en el suelo y favorece la permanencia del inóculo de hongos micorrizógenos (Guadarrama 2008, Guadarrama *et al.* 2014). Esto puede indicar que las prácticas agrícolas de bajos insumos facilitan la permanencia de propágulos infectivos (Sieverding 1990), a diferencia de las prácticas de alta intensidad y de altos insumos (Sangabriel-Conde *et al.* 2010).

Por lo que, las diferentes respuestas de la planta en cuanto a la colonización, no sólo se deben a la identidad taxonómica de la planta hospedera o a la de los

HMA que se encuentren involucrados en la asociación, sino también a las condiciones ambientales (van Aarle *et al.* 2002).

1.3. Método para estimar el potencial de inóculo

Hasta el momento, los estudios realizados para estimar el potencial de inóculo no tienen un método unificado.

Anteriormente, era común evaluarlo a partir del conteo de esporas del suelo a estudiar, partiendo del supuesto de que a mayor número de esporas, se tendría un mayor potencial de inóculo. Sin embargo, (Miller *et al.* 1985, Abbott y Robson 1991) han considerado que el método de conteo de esporas no proporciona una estimación real en cuanto al número de propágulos colonizadores, por varias razones, 1) no contempla otros propágulos, además de las esporas, 2) las esporas pueden ser no viables y, como tal, no deberían ser contabilizadas como propágulos; además de que las esporas suelen acumularse en el suelo y, en ocasiones, no se puede hacer distinción entre las esporas viables y las que no lo son, y 3) la dificultad de contar las esporas de algunos hongos.

Si bien es cierto que el número de esporas refleja la abundancia relativa de múltiples poblaciones de HMA (Dodd *et al.* 1990, Johnson *et al.* 1991), se ha encontrado que no se correlaciona con el número de propágulos colonizadores (Miller *et al.* 1985, Abbott y Robson 1991), ni con el porcentaje de colonización (Johnson *et al.* 1991).

También, el número de propágulos infectivos se puede obtener a partir del porcentaje de colonización de las raíces de las plantas hospederas por los HMA. Las raíces colonizadas se pueden obtener de manera directa (colectadas de suelo en campo) o de manera indirecta (a partir de bioensayos); en ambos casos, las raíces son teñidas y observadas bajo microscopio.

Para obtener las raíces colonizadas mediante bioensayos, se puede hacer de diferentes formas. Una de ellas es sembrando plántulas de especies micotróficas en cilindros de suelo intacto y cosechar las raíces de las plántulas a los 15, 30 y 45 días después de haberlas sembrado. Posteriormente, se

evalúa el porcentaje de colonización, donde el tratamiento con mayor potencial micorrícico o capacidad infectiva será aquél que obtenga el mayor porcentaje de colonización en menor tiempo. Este método no proporciona datos cuantitativos, sino que sirve para comparar los efectos de distintos tratamientos (Johnson *et al.* 1991, Cuenca 2015).

Otro procedimiento es mediante diluciones del suelo, las cuales van de mayor a menor concentración del suelo a evaluar, colocando una planta trampa micotrófica; las macetas son colocadas en incubadora o en invernadero, las raíces de la planta trampa son observadas después de 15, 30, 60 y 90 días después de haber sido colonizadas, obteniendo así el porcentaje de colonización total (Kiers *et al.* 2000, Zangaro *et al.* 2000).

Por último, el método del Número más probable de propágulos infectivos (NMP) que, de igual forma, consiste en hacer diluciones 4^0 a 4^{-8} o con diluciones graduales de 0-100%, ambos métodos con réplicas, colocando plantas trampa micotróficas en invernadero y, después de varias semanas de desarrollo de las plantas (el tiempo depende de la especie vegetal), se hace la cosecha de raíces; aquí lo más importante es detener el experimento cuando se obtengan las primeras colonizaciones en la dilución 4^0 para que, a partir del porcentaje de colonización primario, se pueda estimar el número de propágulos (Porter 1979, Fischer *et al.* 1994, Guadarrama 2008, Luna-González 2009, Romero-Martínez 2009, Guadarrama *et al.* 2014).

Para los métodos donde se obtiene el número de propágulos de manera indirecta a través de bioensayos, es necesario utilizar especies altamente micotróficas probadas pertenecientes a diferentes familias como de la familia Fabaceae, el trébol (*Trifolium subterraneum* L.), carretón (*Medicago truncatula* Gaertn.) y guaje (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit, de familia Poaceae maíz (*Zea mays* L.) y el sorgo (*Sorgum vulgare* L.), de la familia Myrtaceae guayaba (*Psidium guajava* L.), de la familia Amaryllidaceae cebolla (*Allium cepa* L.); también se han utilizado especies típicas de bosque tropical como de la familia Anacardiaceae, *Anacardium excelsum* (Kunth) de Candolle, de la familia Moraceae *Dorstenia panamensis* C.C.Berg y de la familia Cecropiaceae *Cecropia pachystachya* Mart.exMiq (Johnson *et al.* 1991, Fischer *et al.* 1994,

Kiers *et al.* 2000, Zangaro *et al.* 2000, Padilla *et al.* 2004, Guadarrama 2008, Romero-Martínez 2009, Luna-González 2009, Sangabriel-Conde *et al.* 2010, Guadarrama *et al.* 2014).

La colonización micorrícica puede ser estimada mediante la observación de raíces, previamente teñidas con azul de tripano, bajo microscopio estereoscópico con el método de intersección y con el microscopio óptico mediante preparaciones permanentes.

El método del NMP, aunque no necesariamente el más eficiente por el tiempo que requiere para el montaje y desarrollo, se ha reportado como uno de los más confiables (Porter 1979, Padilla *et al.* 2004).

El NMP permite detectar simultáneamente un número de propágulos infectivos, ya sean esporas viables y/o fragmentos de raíces infectadas o micelio. A pesar de ser un proceso que lleva tiempo, tiene como ventaja que el número calculado tiene hasta un 95% de confianza. El método es apropiado para hacer comparaciones entre sistemas con diferentes usos de suelo, si los ensayos se establecen de forma simultánea (Porter 1979, Bagyaraj y Stürmer 2012).

El inconveniente es que al hacer las diluciones hay perturbación del suelo, lo que provoca la ruptura del micelio externo; otra es que puede haber contaminación entre las macetas, o que las condiciones ambientales en invernadero no son iguales a las de campo y, por lo mismo, las esporas contenidas en el suelo no germinan como lo harían en el ambiente de donde provienen. Además, las especies que se usan para el bioensayo tienen que ser micotróficas de rápido crecimiento, tales características superan la desventaja que conlleva el no usar una planta trampa que sea nativa (Fischer *et al.* 1994, Cuenca 2015).

2. Antecedentes

A pesar de la importancia que tiene evaluar el potencial de inóculo, aún carecemos de información acerca de cómo es afectado ante el cambio de uso de suelo en regiones como el trópico húmedo.

2.1. Cambio de uso de suelo

Fischer *et al.* (1994) compararon el número de propágulos con el método del número más probable (NMP) (Porter 1979), en cuatro sitios i) un sitio con pastizal abandonado, ii) dos sitios sin vegetación por 4 y 6 años y iii) un sitio bosque tropical secundario en Costa Rica. En promedio, encontraron mayor número de propágulos en el pastizal (60/100 g), que en sitios sin vegetación (5.1/100 g). Aunque, esperaban que fuera más alto en el bosque tropical secundario por ser dominado por plantas micotróficas; el menor potencial obtenido en el bosque tropical secundario, lo explican dado que el entorno en el que se encontraban las dos plantas trampas 1) cebolla (*Allium cepa* L.) y 2) guayaba (*Psidium guajava* L.), podría no haber sido favorable para la germinación de las esporas o para la formación de las micorrizas; aunque, también argumentan que pudo deberse a que la composición de las especies de HMA es diferente de los otros sitios, favoreciendo solamente el desarrollo de especies de HMA afines a pastizales, y que el método de extracción del suelo destruyó las redes de hifas, siendo el principal propágulo en sitios de bosque tropical con vegetación secundaria.

Mientras que Zangaro *et al.* (2000), encontraron que suelo de un bosque tropical secundario en Brasil, que se encuentra al inicio de la sucesión previamente usado como pastizal, tiene alto porcentaje de colonización total (40 %), comparado con suelo de un claro y suelo de un bosque tropical primario, en promedio (5 y 4%) respectivamente; el porcentaje de colonización total se evaluó mediante diluciones de 0-100% con fragmentos de raíces finas de plántulas de especies leñosas, usando como planta trampa plántulas de *Cecropia pachystachya* Trécul (Cecropiaceae), típicas de bosque tropical. El bioensayo se llevó a cabo por 90 días bajo condiciones de invernadero. También se encontró que el número de esporas es mayor al inicio de la sucesión (304.6/100 g de suelo seco) que en el bosque maduro (5.7 esporas/100 g de suelo seco).

Estos datos apuntan a que al inicio de la sucesión, los HMA son muy eficientes produciendo gran cantidad de propágulos, comparado con un bosque tropical maduro; debido a que la mayoría de las especies de sucesión tardía tienen

bajos requerimientos de HMA y no necesitan absorber grandes cantidades de minerales por su lento crecimiento; además de la baja intensidad lumínica, lo cual se ve reflejado en el bajo potencial de inóculo. Otro factor podría ser la ausencia de plantas hospederas adecuadas, dado que el sitio de muestreo es dominado por especies con baja susceptibilidad a la infección micorrícica (Zangaro *et al.* 2000).

2.2. Uso de suelo

Padilla *et al.* (2004), reportaron la ausencia de propágulos (0 / 100 g), así como 0 % de colonización total de HMA en suelos de Colombia con diferentes usos: i) cultivo de palma africana *Elaeis guineensis* Jacq. (Arecaceae), ii) suelo degradado por minería de aluvión, y iii) bosque secundario de 5 años, resultados similares al tratamiento no-inoculado; de igual forma se reportaron en promedio 6, 9 y 5 esporas/100 g de suelo seco en suelos de cultivo de palma africana, minería de aluvión y bosque secundario, respectivamente. Mientras que suelos inoculados con *G. aggregatum* tuvieron mayor colonización, 74.2%, 17 propágulos/100 g y 37 esporas/100 g de suelo seco. Padilla *et al.* (2004), explican que la ausencia de colonización se encuentra relacionada con el bajo número de propágulos, producto del uso y manejo al que han sido sometidos los suelos; mientras que en el bosque secundario puede ser porque especies forestales secundarias presentan baja dependencia micorrícica.

Mientras que Sangabriel-Conde *et al.* (2010), probaron que en cultivos de papaya *Carica papaya* L. (Caricaceae), el aumento de la aplicación de fertilizantes, reduce el número de propágulos; esto se vio reflejado al evaluar el potencial de inóculo con el NMP, cuya planta trampa fue el maíz (*Zea mays* L.), en tres cultivos con diferentes niveles de aplicación de fertilizantes, alto, mediano y bajo, y una parcela testigo con pasto estrella (*Cynodon dactylon* L.) Pers. (Poaceae), siendo este último donde se presentaron los valores promedio más altos de colonización total (32%), con 777 propágulos/100 g de suelo; a diferencia del suelo de cultivo con altos insumos que, en promedio, presentó el número más bajo de propágulos (10/100 g de suelo), con 10% de colonización total promedio. Esto lo explican por la alta respuesta del pasto estrella a la

micorrización y, principalmente, por el bajo contenido de fósforo disponible en esa parcela (7.0 ppm), a diferencia de los cultivos (55-104 ppm), ya que bastan 34 ppm de fósforo para reducir o impedir la colonización.

Al evaluar el NMP de un bosque tropical seco en Nizanda, Oaxaca, en nueve parcelas en diferentes etapas de sucesión (bosque tropical secundario), como resultado de prácticas agrícolas de maíz, Guadarrama (2008) encontró un porcentaje de colonización total promedio de 49% con 85.42 (\pm 44.17) propágulos/100g suelo seco, y 27 esporas/100 g de suelo seco. De tal forma que prácticas tradicionales de tumba-roza y quema no eliminan los propágulos de los HMA, por lo que no reducen el potencial de inóculo del suelo y, como consecuencia, no afecta su dinámica, lo que hace posible la regeneración natural, por lo que el número de propágulos involucra especies vegetales que se establezcan, así como de la permanencia de las especies de HMA. También encontró que el cambio de uso de suelo y su posterior abandono, no necesariamente eliminan las diferentes fuentes de propágulos, debido a que el establecimiento de malezas y especies pioneras puede ayudar al mantenimiento de la comunidad de HMA por lo que la práctica de roza-tumba-quema es de bajo impacto para la permanencia de propágulos, manteniendo en promedio un alto porcentaje de colonización (37%), siendo mayor en secas (45%) que en lluvias (29%); así como una alta densidad de esporas, en promedio, 80 esporas/100 g de suelo seco, con 48/100 g en secas, y 111/100 g en lluvias.

Asimismo, Guadarrama *et al.* (2014) al estudiar el número de propágulos infectivos en 100 g de suelo seco, en función de la temporalidad y el tiempo de abandono (temprano, medio y tardío) en sitios previamente usados para cultivar maíz, encontraron que, en promedio, el número de propágulos es mayor en secas que en lluvias (108.1 \pm 45 y 37.7 \pm 19.2) respectivamente; siendo mayor en las parcelas de edad media (74.8 \pm 36.6/100 g) en lluvias, y en la edad temprana en secas (190.3 \pm 58.6/100 g), encontrando diferencias significativas para los factores analizados, temporalidad y tiempo de abandono .

En otro estudio, Johnson *et al.* (1991), encontraron que el porcentaje de colonización en campo no se correlacionó con el número total de esporas, ni

con el P total, ni con el número de plantas no hospederas de HMA; pero sí con el pH del suelo, el C soluble en el agua y la biomasa de raíces finas en diferentes usos de suelo (campo de barbecho, cultivo de centeno (*Secale cereale* L.) M. Bieb (Poaceae) y en una cronosecuencia de bosque secundario templado con 1 a 60 años de abandono y tres parcelas de bosques maduros (sabana de encino, pino-encino y de coníferas) en una región templada, Minneapolis, Minnesota. Los autores evaluaron el número total de esporas y el porcentaje de colonización (bioensayo con semillas de maíz), y encontraron que en el campo de centeno y de barbecho, el porcentaje de colonización fue bajo (2.5% y 0.5% respectivamente); mientras que el bosque templado secundario de 19 años presentó el mayor valor (20%); además, los bosques maduros tuvieron, en promedio, el menor porcentaje de colonización (3.4%). Estos resultados apoyan la hipótesis de Janos (1980) que plantea que después de un disturbio en regiones templadas, la población de HMA aumenta y luego disminuye cuando llega a predominar una comunidad forestal, la cual se caracteriza por ser hospederas de hongos ectomicorrícicos.

Aunque, Johnson *et al.* (1991) señalan que también podría deberse al cambio de vegetación y acumulación de nutrientes, ya que el C soluble en agua fue el único factor que se correlacionó de manera positiva, tanto con el porcentaje de colonización como con el número total de esporas, lo que sugiere que existe una interrelación entre las propiedades del suelo y la abundancia de HMA.

En Nizanda, Oaxaca, Romero-Martínez (2009), reportó para un bosque tropical caducifolio pero establecido sobre diferentes suelos, valores muy altos (2,462/100g de suelo) y muy bajos (9/100g de suelo) en el mismo tipo de vegetación, utilizando el NMP, Mientras que el matorral subserotino tuvo un alto número de propágulos promedio ($1,465.3 \pm 275.9$). Este autor esperaba que el bosque maduro tuviera un mayor número de propágulos al tener una gran riqueza de especies vegetales; sin embargo, no fue así; señalando que el resultado podría estar relacionado con el tipo de suelo, muy arenoso con bajo contenido de materia orgánica y de nutrientes. Por lo que concluye que la heterogeneidad ambiental, dada por las variables edáficas, puede ser otro factor determinante para el número de propágulos.

2.3. Potencial de inóculo en Los Tuxtlas

Por su parte, Luna-González (2009), al comparar consorcios de HMA provenientes de fragmentos de diferentes tamaños de bosque tropical perennifolio, encontró que los fragmentos de superficie pequeña sostienen una gran riqueza de especies de HMA, así como un alto número de propágulos infectivos y un alto potencial de colonización, sugiriendo que fragmentos de tamaño pequeño pueden ser importantes fuentes de propágulos. Durante la temporada de lluvias, estimó, en fragmentos chicos, un total de 9 246 ($\pm 3 991.7$) propágulos en 50g de suelo con alto porcentaje promedio de colonización 32% (± 5.03) y mayor número esporas 20.14 (± 13.86); a diferencia de fragmentos grandes que, a pesar de tener mayor número de propágulos 12 709 ($\pm 3 436.3$), tuvieron menor porcentaje de colonización 21.67 (± 3.36) y número de esporas 19.81 (± 13.3). Concluyendo que el número de propágulos no influye sobre la capacidad de colonización de los HMA en las raíces de las plantas, siendo la cantidad de fósforo en el suelo, la identidad de las especies de HMA y de plantas, los factores que pueden influir sobre la colonización.

En este sentido, el presente estudio se encuentra enmarcado en el proyecto PAPIIT IN116874 “Almacenes de carbono en el suelo de una selva húmeda: la contribución de los hongos micorrizógenos arbusculares”, cuyo principal objetivo fue analizar el impacto del cambio de uso de suelo en las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo en un bosque tropical perennifolio y su efecto sobre los almacenes de carbono. En este sentido mi objetivo general fue:

3. Objetivo general

Estimar el potencial de inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en diferentes usos de suelo en la región de Los Tuxtlas, Veracruz en condiciones contrastantes.

Objetivos particulares

- Estimar el número de propágulos colonizadores en cada uno de los usos de suelo (bosque tropical perennifolio primario, bosque tropical secundario, potrero y cultivo), en temporada de lluvias y sequía.
- Evaluar el porcentaje de colonización radical total y por estructura de los HMA, en los cuatro diferentes usos de suelo, en temporada de lluvias y sequía.

4. Hipótesis

Si las prácticas de uso y manejo (uso de fertilizantes fosfóricos y pesticidas), modifican las propiedades químicas del suelo y, a su vez pueden afectar el establecimiento de la simbiosis micorrícica, se espera encontrar menor potencial de inóculo y menor porcentaje de colonización en suelos de cultivo y potrero. A diferencia de suelos de bosque tropical perennifolio primario y secundario que al ser sitios con poca o nula intervención antrópica, se espera encontrar un mayor potencial de inóculo y mayor porcentaje de colonización.

Debido a la influencia que tiene la estacionalidad sobre la fisiología de la planta hospedera y, por tanto, en la asociación micorrícica, se espera encontrar mayor colonización y un mayor potencial de inóculo en la temporada de lluvias, que en la temporada de sequía.

5. Método

5.1. Zona de estudio

La Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas, se encuentra al sureste del estado de Veracruz, cuyas coordenadas geográficas van de 95° 04´ a 95° 09´ de longitud oeste y de 18° 34´ a 18° 36´ latitud norte, con una superficie total de 155,067 ha (Fig. 2), con altitudes que varían entre 150 y 500 ms.n.m. (Lot-Helgueras 1976). Fue decretada Reserva de la Biosfera en 1998.

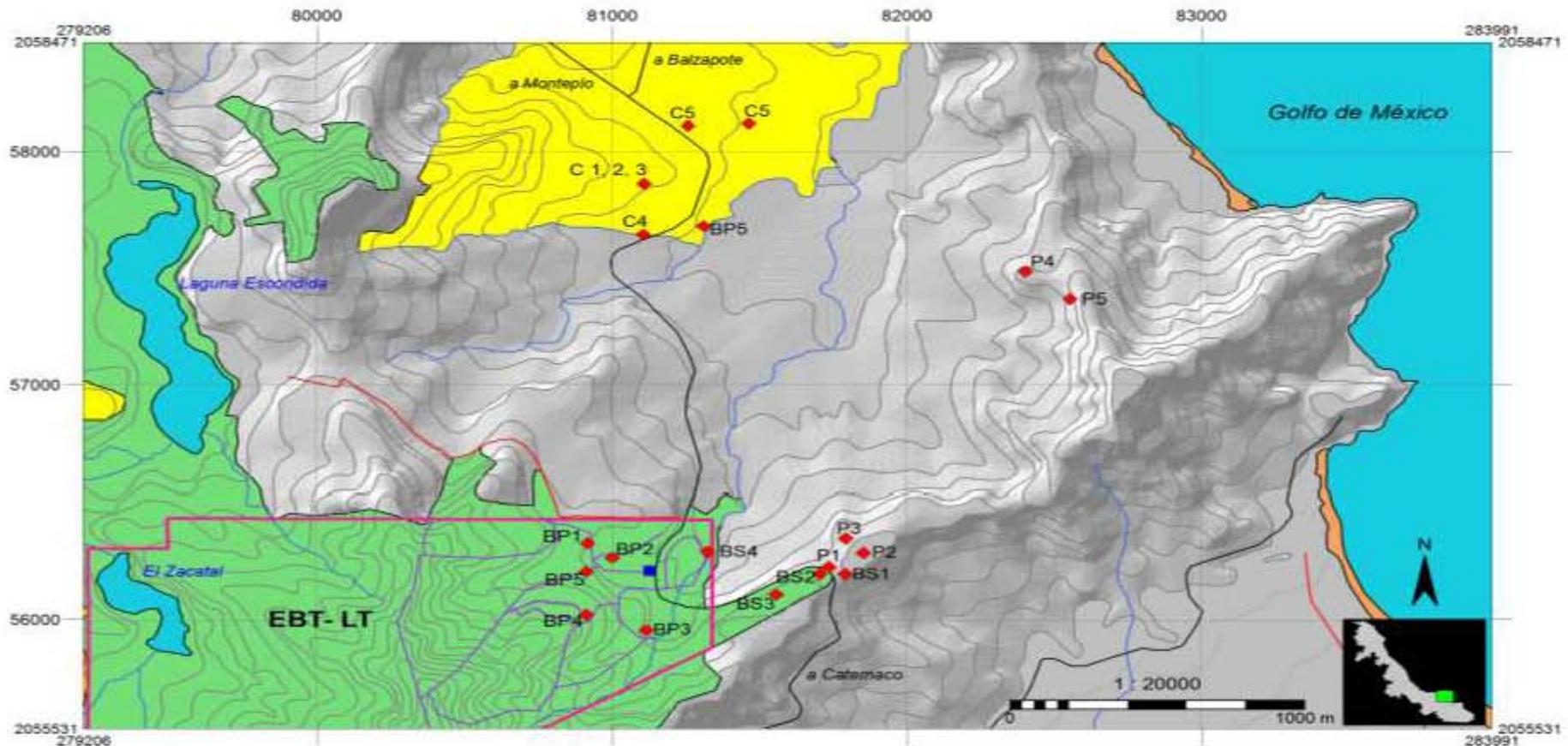
5.2. Clima

Predomina el clima cálido-húmedo, con temperatura media anual de 20 °C y mínima de 18 °C; con estacionalidad marcada, donde la temporada de sequía corresponde de marzo a mayo con precipitación promedio de 110 ± 2.46 mm y para la temporada de lluvias de junio a febrero con 386.12 ± 49.0 mm. Se considera como una de las regiones con mayor precipitación del país, donde la precipitación total media anual es de 4 000 mm (Soto 2004, Estación de Biología Tropical).

Existen nueve tipos de vegetación original reportados en la región de Los Tuxtlas, predominando en nuestra zona de estudio el bosque tropical perennifolio. La forma de crecimiento más común es la herbácea con un 52%, seguidas de las arbóreas (20%), arbustiva (17%) y lianas (11%) (Castillo-Campos y Laborde, 2004).

5.3. Vegetación

La vegetación predominante está clasificada como bosque tropical perennifolio. Su importancia radica como zona de protección forestal por la presencia de especies vegetales tropicales y templadas, y refugio para la fauna silvestre; además de ser uno de los ecosistemas más ricos en biodiversidad, pero es uno de los más amenazados (Castillo-Campos y Laborde 2004) (Fig. 2). Por ello, durante varios años se han realizado esfuerzos de prácticas de conservación y restauración ecológica, con la participación de universidades e instituciones a través de varias investigaciones en torno a la dinámica del bosque tropical perennifolio (Castillo-Campos y Laborde 2004).



Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas (EBT-LT), Extremo Oriental, Veracruz, México
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Sistema de Coordenadas: UTM
 Datum: WGRS84
 Separación entre curvas de nivel: 20m
 Elaborado con base en Carta Topográfica E 15 A63 Nueva Victoria (INEGI, 2016) y Sistema de Veredas Extremo Oriental de la EBT-LT editado por Quinto, A.D. y Costes, R. (s.f.)
 Autor: Isaac Romeo Acevedo Rojas (2017)
 UNAM, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Ecología del Suelo

Simbología	
■ Vegetación natural	■ Edificios EBT-LT
■ Zona de cultivos	— Límite EBT-LT
■ Otros usos (Pastizal, Urbano...)	— Sistema de veredas - Área de investigación EBT-LT
■ Cuerpos de agua	— Carretera
— Corrientes de agua	— Camino local
	● Sitios de muestreo

Figura 2. Localización de los puntos de muestreo para este estudio, (Acevedo-Rojas 2017) BP=Bosque tropical perennifolio primario, BS= Bosque tropical secundario, P=potrero, C=cultivo.

5.3.1. Bosque tropical perennifolio primario

Se encuentra en terrenos inclinados ocupando una superficie de 34 896.58 ha, igual al 22.50% de la reserva. Crece en Litosoles rojos arcillosos, Litosoles de derrames lávicos, Regosoles de cenizas volcánicas y aluviales, llega a ubicarse desde el nivel del mar hasta los 700 m de altitud (Castillo-Campos y Laborde, 2004).

Tiene formas de crecimiento muy variadas, podemos encontrar árboles de diferentes tallas con altura menor a 20 m o mayor a 35 m, lianas, trepadoras, herbáceas, hemiepífitas, epífitas, palmas y arbustos. La vegetación es considerada perenne por conservar sus hojas todo el año, y el dosel va de 30 m o más; además de ser denso y cerrado. En el sotobosque, encontramos árboles menores a 10 m, por ejemplo la palmera *Astrocaryum mexicanum* Liebm. ex Mart (Arecaceae), la cual está presente de manera abundante (Castillo-Campos y Laborde, 2004). A pesar de ser el tipo de vegetación que más predomina dentro de la reserva, es uno de los más amenazados por la deforestación (eliminación de la cobertura original de la selva) con fines antropogénicos, dando lugar a potreros, cultivos y bosques secundarios.

5.3.2. Bosque tropical secundario

Con una superficie de 19 015.92 ha que equivalen al 12.26% de la Reserva, la composición vegetal de este uso de suelo es muy variable y depende de la influencia de la vegetación que se encuentra a su alrededor, de la presencia de semillas, frutos y tocones, así como del tiempo de abandono. Se pueden agrupar según el tipo de vegetación que les haya precedido y también según el tiempo de regeneración o de recuperación que tienen; En la región, a este tipo de vegetación se le conoce como acahuales, donde los acahuales jóvenes o de monte bajo tienen un tiempo de abandono menor o igual a cinco años, cuya vegetación corresponde a especies arbustivas y herbáceas, y llegan a coincidir especies pioneras típicas de claros de bosque tropical perennifolio primario y ruderales típicas de zonas perturbadas, y su riqueza no es tan alta como los acahuales viejos o de monte alto con un tiempo de abandono mayor a cinco

años, donde además predominan las formas de crecimiento arbóreas (Castillo-Campos y Laborde 2004, CONANP 2011).

5.3.3. Potrero

Los potreros son el uso de suelo en los que con mayor frecuencia se convierte el bosque tropical perennifolio original, su cobertura representa el 50.92% del total de la superficie de la reserva (78 970.03 ha) (CONANP 2011). La ganadería tropical ha sido uno de los factores más importantes en la disminución de la superficie de las selvas en México.

Son muy ricos en especies herbáceas, la composición florística del potrero depende de la forma en que se transforma en potrero o puede deberse al contacto con sus alrededores ya sea un cultivo, bosque secundario (acahual) o bosque primario. En muchas ocasiones a los potreros le anteceden parcelas de cultivo o provienen directamente de la tala de la selva. En general, las familias de plantas que predominan en los potreros por su número de especies son Asteraceae (26), Poaceae (24) y Leguminosae (20). Los pastos locales que se pueden encontrar son *Paspalum conjugatum* y *Axonopus compressus* (Guevara *et al.* 1997) y el pasto grama se establece después de la cosecha de maíz; por otro lado, hay pastos introducidos como el pasto estrella (*Cynodon plectostachyus* (K.Schum.) Pilg.), su siembra es mediante estolones antes de la cosecha (Castillo-Campos y Laborde 2004). Actualmente, en potreros, predomina el pasto “insurgente” (*Bracharia brizantha*) (obs. pers.).

5.3.4. Cultivo

Básicamente, la gente elimina la cobertura vegetal del bosque primario, para el establecimiento de cultivo en las tierras con pendientes menores a 5%. En total, los cultivos ocupan 1 648.92 ha, equivalente al 1.06% de la reserva (CONANP 2011).

La agricultura que se practica en la zona es de roza-tumba-quema, la cual consiste en el desmonte de la vegetación con ayuda de machetes y hachas; posteriormente, se deja secar para poder quemarla. Sin embargo, también se les adiciona una gran cantidad de insecticidas y fungicidas; además de los fertilizantes de uso más general. Los cultivos pueden ser de especies anuales,

perennes, nativas e introducidas. Hay cultivos perennes de mango, aguacate, cítricos, maíz, cacao, caña, tabaco o cultivos de valor comercial como el chile, pepino, sandía y piña (Castillo-Campos y Laborde 2004).

5.3.5. Cambio de uso de suelo

Uno de los problemas que enfrenta la Reserva, es la degradación y fragmentación por actividades antropogénicas (principalmente por ganadería y agricultura); lo que a su vez ha provocado la reducción de la cobertura vegetal en la Reserva. La cobertura forestal se redujo de 46.38% en 2007, a 45.79% (70 996 ha) en 2011. Mientras que el área no forestal (pastizales, cultivos, asentamientos humanos y suelos sin vegetación) con un área de 82 145 ha que equivalen al 53% de la reserva (CONANP 2007, CONANP 2011).

5.4. Muestreo en campo

Seleccioné cuatro usos de suelo (Bosque tropical perennifolio primario (BP), Bosque tropical secundario (BS), potrero (P) y cultivo (C) de sandia, chile y maíz, adicionados con fertilizantes y fungicidas, sin tiempo de barbecho (tiempo de descanso). Realicé dos muestreos, uno para cada temporada. Para la temporada de sequía, en el mes de abril de 2015, y para la temporada de lluvias, en septiembre de 2015. En ambas temporadas, realicé la misma técnica de muestreo.

Por cada uso de suelo, seleccioné cinco sitios y para cada sitio, tracé un cuadro de 30 x 35 m (0.1 ha/1 050 m²) (Fig. 3), y al interior de él colecté, con un nucleador de 21cm x 8 cm, el suelo de cinco puntos seleccionados al azar, teniendo un total de 25 puntos por cada uso de suelo (5 sitios x 5 puntos); 100 puntos en total muestreados por temporada.

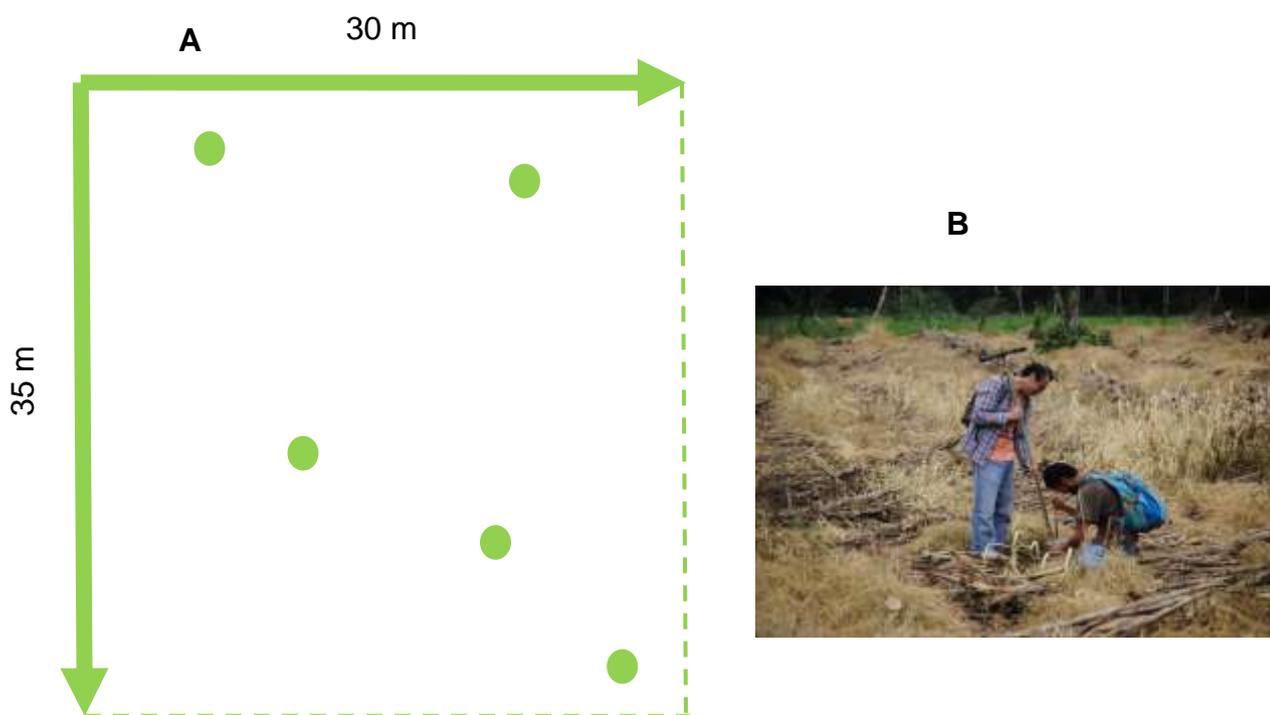


Figura 3. Muestreo. **A)** Ubicación de las líneas y puntos de muestreo. **B)** Potrero y nucleador con muestra de suelo. Fotografía de D. Hernández 2015

5.5. Estimación del potencial de inóculo

Todas las muestras colectadas, las puse a secar a temperatura ambiente; una vez secas, las tamicé con un tamiz con apertura de 2 mm, con el fin de eliminar raíces gruesas, pequeñas ramas y hojarasca; de cada muestra, tomé 100 g para, posteriormente, mezclarlos y homogeneizarlos, con el fin de tener muestras compuestas de 2 500 g, por cada uso de suelo.

5.5.1. Trabajo en invernadero

Para estimar el número más probable (NMP) de propágulos colonizadores, para ambas temporadas, utilicé el método de Porter (1979), el cual consiste en el montaje de un bioensayo bajo condiciones de invernadero; para ello, se debe registrar la primera colonización de los HMA, la cual se alcanza aproximadamente en las primeras seis semanas de crecimiento para sorgo (Ramos-Zapata, com. pers.).

De acuerdo con Bagyaraj y Stürmer (2012), para la puesta del método del NMP, primero esterilicé una mezcla de arena sílica de grosor 20-30 (0.600 a 0.425 mm), (Arenas sílicas de Juanita, S.A. de C.V.) y arena de grano fino, proporción 1:1 v/v, yo lo hice en un autoclave, sin presión, por una hora, a 90°C, y como planta trampa usé sorgo (*Sorghum vulgare* L., Poaceae), ya que es una planta que establece interacción con los HMA. Puse a germinar las semillas de sorgo, ya germinadas y con una talla aproximada de 5 cm de alto, las coloqué en las macetas preparadas como indico a continuación,

Posteriormente, preparé las macetas de propagación, usando vasos de cartón de 250 mL. En cada vaso, coloqué 200 g de la arena estéril, luego 50 g del suelo a evaluar y, al final, adicioné 50 g de la mezcla de arena para proteger el suelo de contaminación por HMA (Fig. 4).

El suelo a evaluar consistió en una mezcla de suelo y arena, a diferentes concentraciones, de tal forma que la dilución 0 fue el suelo tal cual fue extraído del campo, seco y tamizado sin arena; la dilución 1 es el resultado de mezclar suelo de la dilución 0 y arena en una proporción 1:4 p/p, respectivamente. La dilución 2, resulta de homogeneizar suelo de la dilución 1 con arena estéril, en una proporción 1:4 p/p, y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 9. De esta forma, la relación que se establece entre cada dilución es 4^{-n} con cinco replicas para cada dilución (Apéndice I).

Una vez preparadas las macetas, sembré dos plántulas de sorgo en cada una; después de dos semanas en caso de que las dos sobrevivieran, eliminé una, para tener una plántula por maceta. En total, 50 macetas, por los cuatro usos de suelo, resultaron en 200 macetas, por temporada. Dado que la arena utilizada como sustrato tiene baja concentración de nutrientes, las primeras dos veces de riego, usé el medio nutritivo de Hoagland (Apéndice 2). Se realizó el riego durante las seis semanas, cada tercer día.

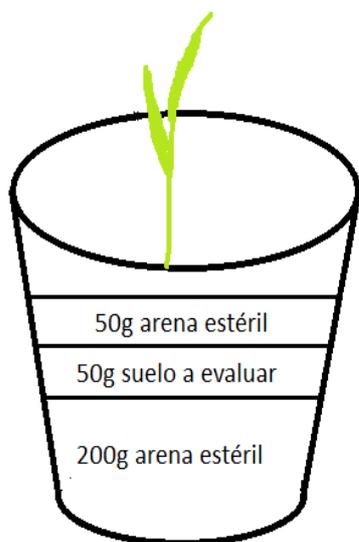
A**B**

Figura 4. Macetas de propagación, A) Muestra los sustratos de cada maceta.

B) Macetas en invernadero, control "0" y las nueve diluciones por cada uso de suelo (4^0 a 4^{-9}), con una plántula de sorgo. Esquema y fotografía por I. Cervantes 2015.

Después de seis semanas, coseché las raíces que se encontraban en contacto con el suelo diluido (Fig. 5), las lavé con agua corriente y las coloqué dentro de rejillas histológicas, previamente etiquetadas, de acuerdo al uso de suelo y dilución, para posteriormente teñir las raíces (Bagyaraj y Stürmer 2012).

Corte de raíces en el sustrato que tiene el suelo a evaluar

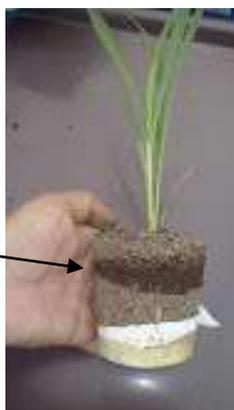


Figura 5. Cosecha de raíces de sorgo como parte del método del número más probable (NMP) de propágulos infectivos. Fotografía por I. Cervantes 2015.

5.5.2. Tinción de raíces

Teñí las raíces según el método de Philips y Hayman (1970) (Apéndice 3) usando azul de tripano (Fig. 6). Posteriormente, coloqué 25-30 fragmentos de raíces, de aproximadamente 2 cm de largo, por cada laminilla y usé alcohol polivinílico para fijarlas; después, las dejé secar a 50°C durante una semana, en una estufa. Finalmente, observé a microscopio, a 200 aumentos, cada uno de los segmentos radicales, con el fin de registrar la presencia o ausencia de estructuras de HMA y, con esos datos, estimar el NMP de propágulos.

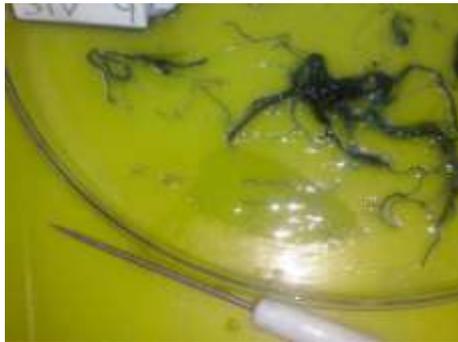
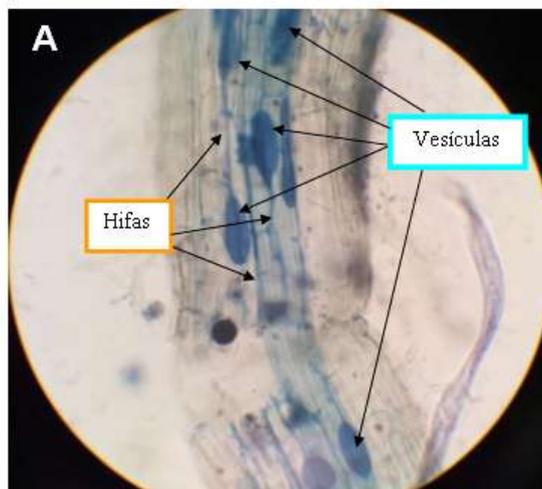


Figura 6. Raíces de sorgo teñidas con azul de tripano en caja petri, para evaluar el porcentaje de colonización por (HMA). Fotografía por I. Cervantes 2015.

5.5.3. Porcentaje de colonización

El porcentaje total de colonización por HMA y por estructura (arbúsculos, vesículas y esporas) (Fig. 7), los estimé solamente para la dilución “0”, aplicando el método de intersección (McGonigle *et al.* 1990) (Apéndice 4).



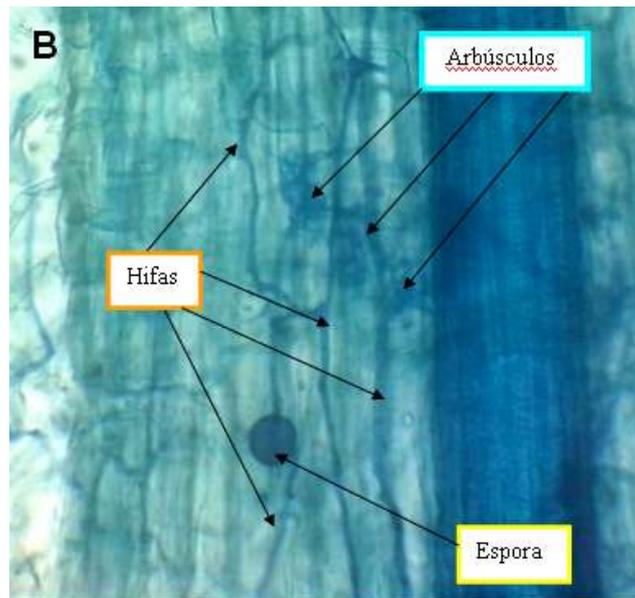


Figura 7. Raíz de sorgo colonizada. A) Hifas con vesículas (200 aumentos); B) Hifas con arbúsculos y una espora (400 aumentos). Fotografía por I. Cervantes 2016.

5.5.4. Proporción de la colonización de las diluciones

Estimé la proporción de la colonización de cada dilución, de la “0” a “9”, esto con el propósito de comprobar si se cumple el supuesto que el suelo más diluido debe promover una menor colonización (Porter 1979).

5.6. Análisis de datos

5.6.1. Porcentaje de colonización micorrícica

Calculé el porcentaje de colonización micorrícica total con la siguiente fórmula:

$$\%Col. total = \frac{\text{No. total de campos observados con alguna estructura fúngica}}{\text{No. total de campos contabilizados}} \times 100$$

Asimismo, calculé el porcentaje de cada una de las estructuras encontradas (arbúsculos, vesículas, esporas) en las preparaciones, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Col. estructura} = \frac{\text{No. total de campos observados con la estructura "X"}}{\text{No. total de campos contabilizados}} \times 100$$

5.6.2. Número de propágulos infectivos

Estimé el NMP de propágulos infectivos de HMA, de acuerdo a la ecuación de Porter (1979), para cada uso de suelo: BP, BS, P y C, para ambas temporadas, con la siguiente fórmula (Ramos-Zapata *et al.* 2008):

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

Donde:

Log (λ) = Log (número más probable de propágulos)

X = N° total de macetas colonizadas/N° de replicas 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)

Para calcular los límites de confianza se usó la siguiente fórmula (Ramos-Zapata *et al.* 2008).

$$\text{Log } \lambda \pm (\hat{S}_\lambda / \sqrt{n}) (z)$$

Donde:

Log λ = log (número de organismos infectivos)

$\hat{S}_\lambda = 0.201$ para la dilución con cinco réplicas

n = número de repeticiones por dilución

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

5.6.3. Análisis estadísticos

Para saber si los valores de los porcentajes de colonización, cumplían con una distribución normal, apliqué dos pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) con el paquete estadístico STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc., 2000). Al no ser los datos normales, los transformé con el arcoseno de la raíz cuadrada de cada dato, para cumplir con los supuestos del análisis de varianza de dos vías (ANOVA), prueba que usé para determinar si había diferencias significativas entre usos de suelo (BP, BS, P y C) y entre temporadas (lluvias y sequía), y evaluar si la interacción de ambos factores fue significativa (Álvarez-Santiago *et al.* 1996).

En caso de que algún factor generara diferencias significativas, procedí a aplicar una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, para identificar las medias diferentes con el paquete STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc., 2000).

5.6.3. Estimación del NMP de HMA con el programa Dilution

Seleccioné aleatoriamente, cuatro de las cinco réplicas que tuve por cada dilución, para cada uno de los usos de suelo, dado que el programa solamente usa cuatro replicas; elaboré un cuadro donde únicamente registré ausencia o presencia de alguna estructura fúngica, usando valores de cero y uno, respectivamente. Posteriormente, ejecuté el programa Dilution (Ramos-Zapata 2016), el cual consiste en calcular los límites inferiores y superiores más probables con base en los valores de λ estimados por máxima verosimilitud (Ramos-Zapata *et al.* 2008). Este programa permite estimar el número de propágulos a través de la máxima verosimilitud, que además permite detectar diferencias significativas entre factores, en este caso sitios y temporadas (Ramos-Zapata *et al.* 2011), partiendo de la hipótesis de que conforme el suelo está más diluido, se registrará menor número de réplicas, de raíces con colonización.

5.6.4. Proporción de la colonización de las diluciones

Por cada dilución, estimé la proporción de la colonización a partir de la siguiente fórmula, obteniendo un promedio de las cinco réplicas de cada dilución:

$$\text{Proporción} = \frac{\text{Campos colonizados}}{\text{Total de campos observados}}$$

6. Resultados

6.1. Porcentaje de colonización total

El mayor porcentaje de colonización total promedio correspondió a la temporada de sequía (16.2 ± 1.4), siendo diferente significativamente de la temporada de lluvias (12.4 ± 2.9) ($F_{(1,32)} = 6.61$).

Al estimar el porcentaje de colonización total promedio por cada uso de suelo, encontré que el potrero (P), fue el que tuvo mayor porcentaje de colonización (24.59 ± 3.50), seguido del bosque tropical secundario (BS) (13.17 ± 1.62), después el cultivo (C) (10.49 ± 3.21) y, por último, el bosque tropical perennifolio primario (BP) (8.90 ± 2.06). Hubo diferencias significativas entre usos de suelo ($F_{(3,32)} = 11.48$, $p < 0.05$). La prueba de Tukey formó dos grupos: **(a)** P, **(b)** BP, BS y C, siendo el primer grupo, el de mayor colonización (Fig. 8).

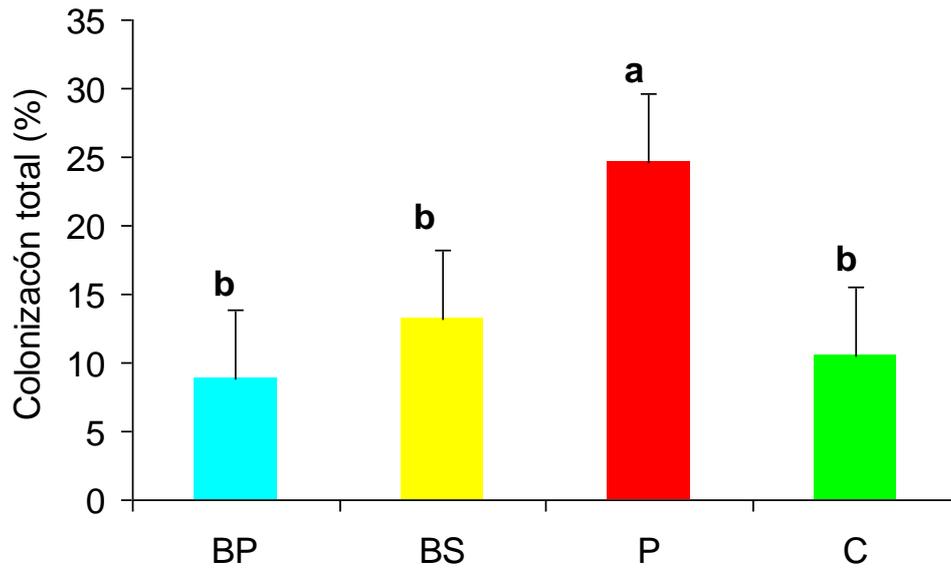


Figura 8. Promedio del porcentaje de colonización total por cada uso de suelo (+1E.E.). Letras diferentes indican diferencias significativas. Prueba de Tukey, $p < 0.05$.

La interacción de ambos factores, uso de suelo y temporada, fue significativa ($F_{(3,32)} = 9.42$, $p < 0.05$). La prueba de Tukey mostró que el potrero, en la temporada de lluvias, con el porcentaje de colonización total promedio mayor (30.40 ± 5.67), se diferenció significativamente del cultivo en lluvias, que presentó el menor valor de todos (1.36 ± 0.44), siendo los valores extremos en el porcentaje de colonización total. Los otros grupos tuvieron porcentajes de colonización intermedios (Fig. 9).

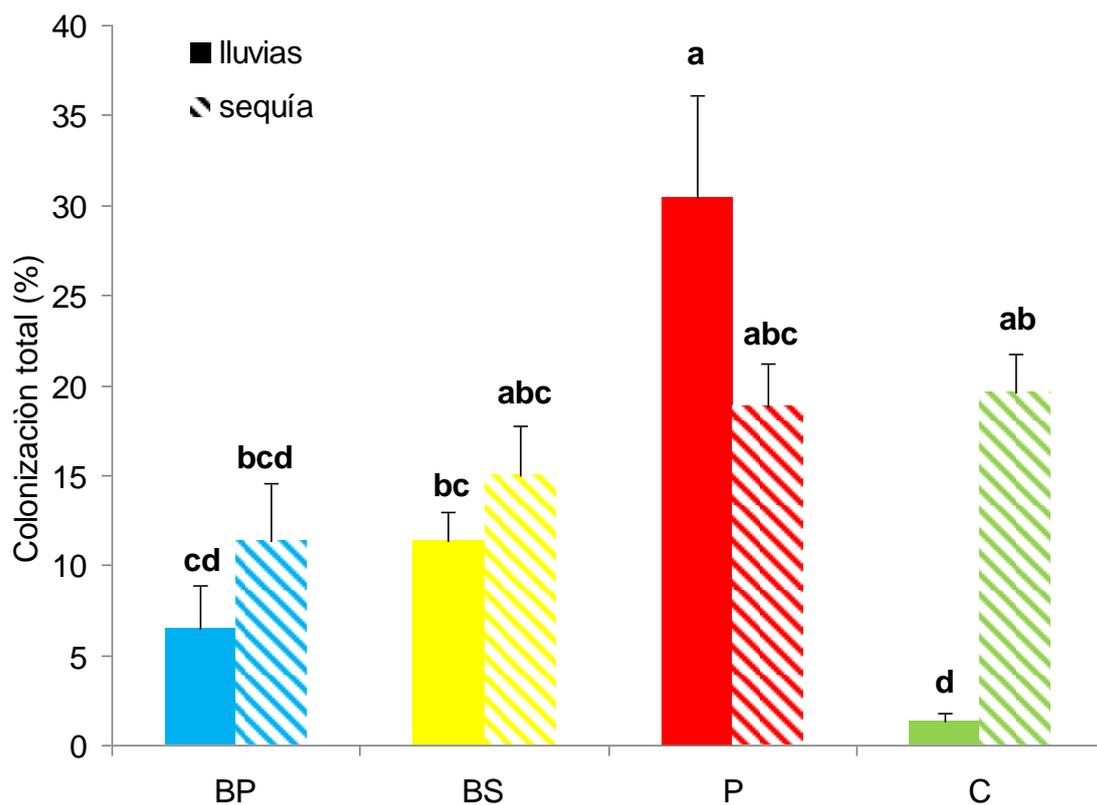


Figura 9. Porcentaje de colonización total por uso de suelo (+1E.E.).
 ■ Temporada de lluvias lado izquierdo. ▨ Temporada de sequía lado derecho. Letras diferentes señalan diferencias significativas. Prueba de Tukey, $p < 0.05$.

6.2. Porcentaje de colonización por estructuras

En promedio, se encontró mayor colonización por hifas (10.05 ± 1.7) que por esporas (4.88 ± 1.1). La temporada de muestreo generó diferencias significativas para ambas estructuras: hifas ($F_{(1,32)} = 4.81$) y esporas ($F_{(1,32)} = 76.53$), donde encontré que el mayor porcentaje de colonización por hifas (12.2 ± 2.9) fue en lluvias; mientras que en sequía fue mayor por esporas (9.41 ± 1.6) (Fig. 10).

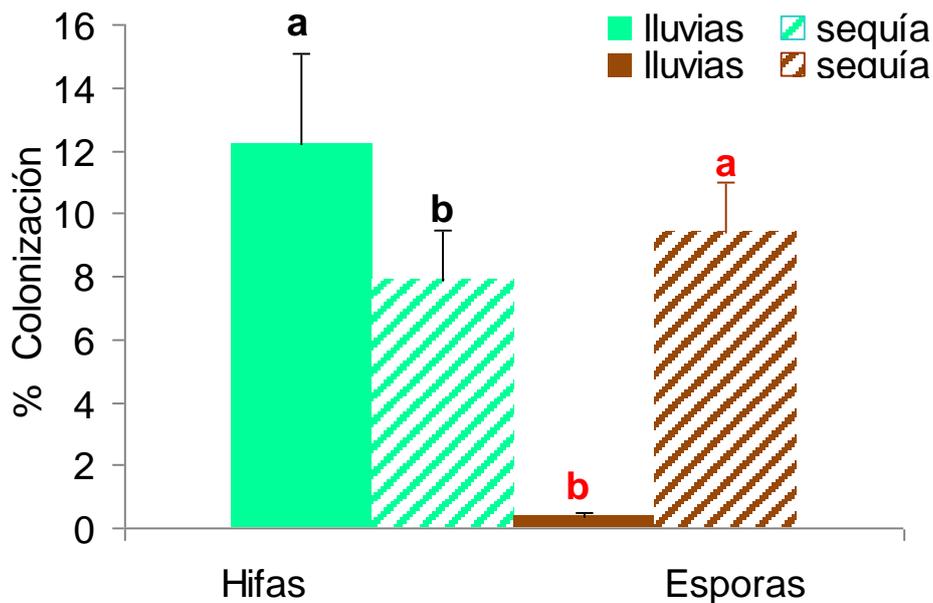


Figura 10. Promedio del porcentaje de colonización por estructura (+1E.E.). Letras diferentes indican diferencias significativas. a) mayor colonización por hifas, b) menor colonización por hifas y a) mayor colonización por esporas, b) menor colonización por esporas. Prueba de Tukey, $p < 0.05$.

Al estimar el porcentaje de colonización por estructura, en cada uso de suelo, encontré diferencias significativas para ambas estructuras: hifas ($F_{(3,32)} = 33.85$) y esporas ($F_{(3,32)} = 6$). (Fig. 11).

Las raíces evaluadas con suelo de potrero, tuvieron mayor colonización promedio por hifas (21.30 ± 4.08); mientras que las raíces del cultivo tuvieron el menor valor (2.76 ± 0.78). En cuanto a la colonización por esporas, este último fue el que tuvo mayor porcentaje de colonización (7.98 ± 2.83), a diferencia del BS que fue el uso de suelo con la menor colonización promedio (0.72 ± 0.35). De acuerdo a la prueba de Tukey, en cuanto al porcentaje de colonización por hifas, se formaron dos grupos donde **(a)** P y BS, tuvieron el mayor porcentaje de colonización; mientras que **(b)** BP y C, tuvieron los menores valores. También en la colonización por esporas, por uso de suelo, se formaron dos grupos de acuerdo a la prueba de Tukey, **(a)** cultivo, BP y P, con mayor colonización, y **(b)** BS, con menor colonización.

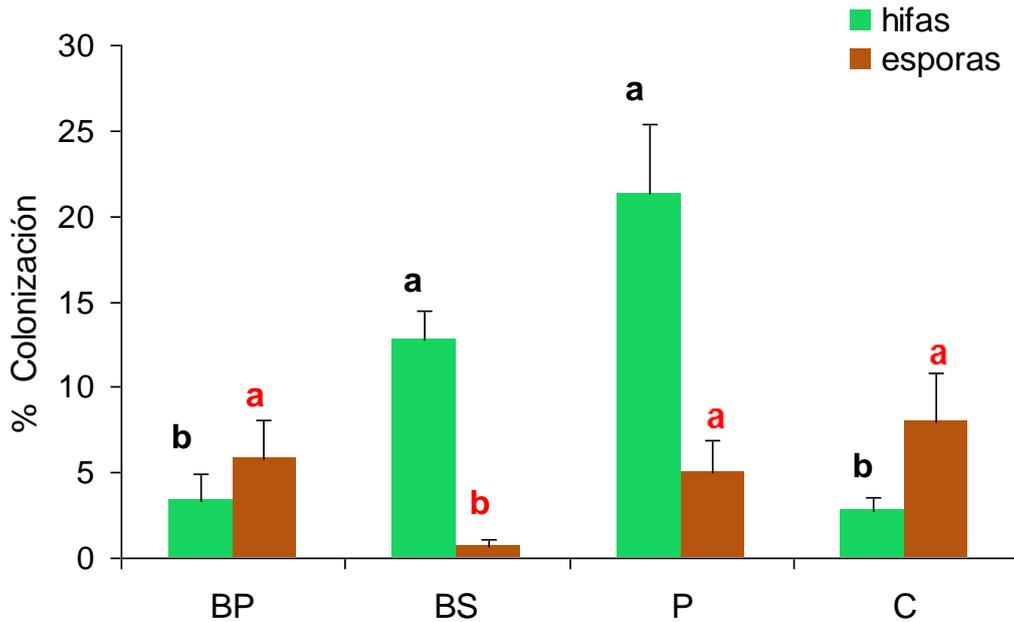


Figura 11. Promedio del porcentaje de colonización por estructura por cada uso de suelo (+1E.E.). Letras diferentes indican diferencias significativas. a) mayor colonización y b) menor colonización. Prueba de Tukey, $p < 0.05$.

La interacción uso de suelo y temporada fue significativa, tanto para el porcentaje de colonización por hifas ($F_{(3,32)} = 9.07$) como por esporas ($F_{(3,32)} = 3.94$). De acuerdo a la prueba de Tukey, en el caso de las hifas, el potrero en lluvias (30.13 ± 5.41) fue el que tuvo el mayor porcentaje promedio y fue diferente significativamente del resto, al igual que el BP en sequía que tuvo los valores más bajos (0.51 ± 0.31) (Fig. 12).

En el caso de las esporas, no se repitió el patrón de las hifas, y los mayores valores correspondieron al C (15.71 ± 2.44), BP (11.15 ± 3.05) y P (9.34 ± 2.5), en la temporada de sequía; mientras que los valores más bajos se dieron en el BS en lluvias (0), seguido del C en lluvias ($0.24\% \pm 0.24$) (Fig. 12).

De manera particular, las raíces del suelo de potrero, además de hifas y de esporas, presentaron otros propágulos (arbuscúlos, ovillos y vesículas), en ambas temporadas. Los valores de la colonización por las estructuras anteriormente mencionadas, fueron arbuscúlos con (2.1 ± 0.3), ovillos con (0.2 ± 0.2) y vesículas con (1.4 ± 0.7), para la temporada de lluvias; aunque, las

mismas estructuras también fueron observadas en la temporada de sequía, sus valores fueron aún más bajos: arbusculos (0.6 ± 0.4), ovillos (0.4 ± 0.2) y vesículas (0.6 ± 0.3).

Las raíces del uso de suelo de BS, también presentaron arbusculos, únicamente en la temporada de lluvias, con valor promedio de (0.4 ± 0.4).

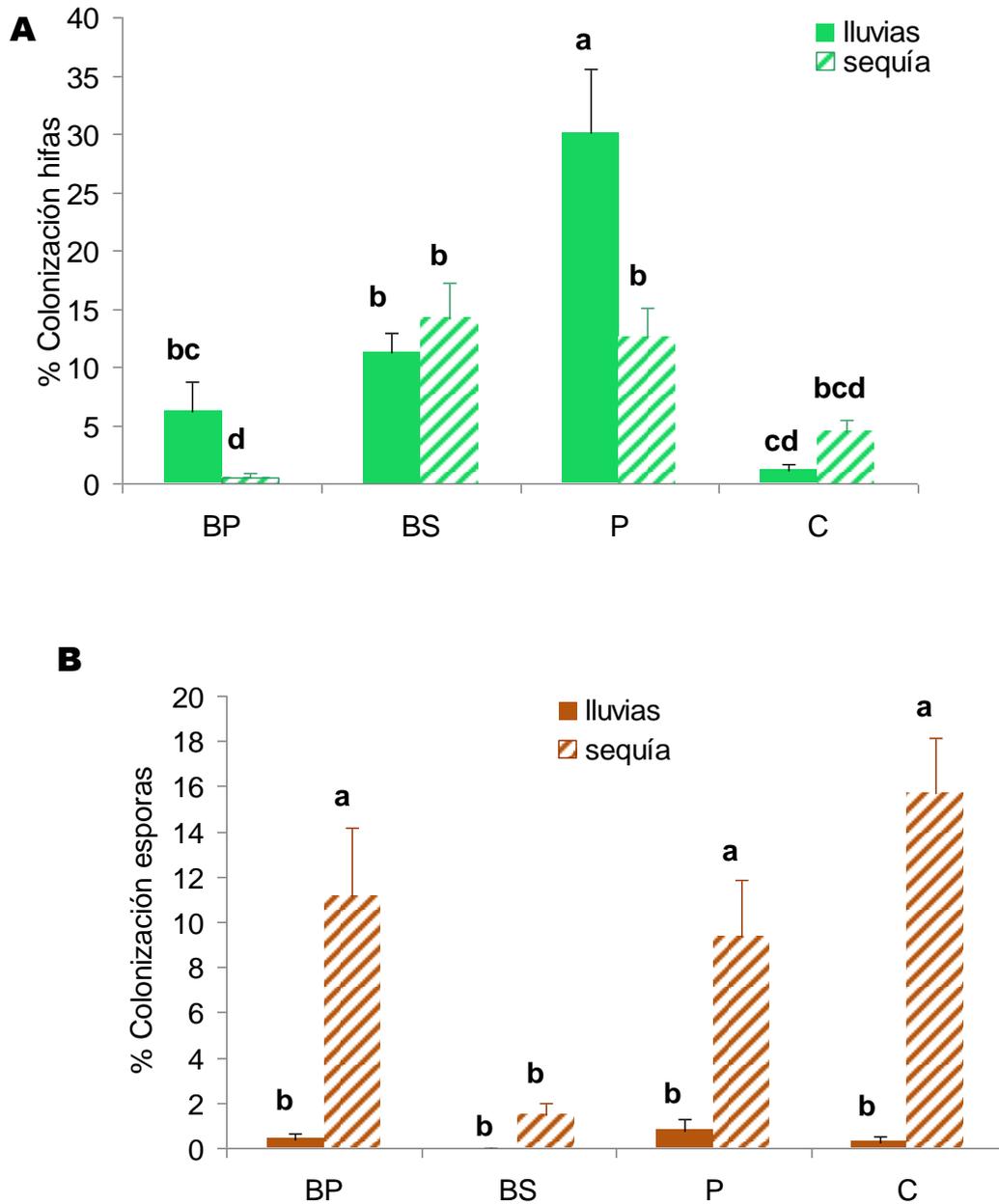


Figura 12. Porcentaje de colonización de hifas (color verde) y esporas (color café) en cada uso de suelo (+1E.E.). Letras diferentes indican diferencias significativas. Prueba de Tukey, $p < 0.05$.

6.3. Potencial de inóculo

6.3.1. Número de propágulos

El NMP de propágulos infectivos, calculados a partir de la fórmula, fue semejante para ambas temporadas. En la temporada de lluvias, en promedio, se estimaron 2.27×10^5 ($\pm 0.75 \times 10^5$) propágulos en 50 g de suelo; mientras que en la temporada de sequía, fueron 2.26×10^5 ($\pm 1.45 \times 10^5$) propágulos. Sin embargo, al estimar el NMP por uso de suelo, en ambas temporadas se observaron diferencias significativas, de acuerdo a los límites, inferior y superior. El BS en lluvias y el C en sequía, tuvieron los valores más bajos; mientras que el P tuvo el mayor número de propágulos en ambas temporadas, seguido del BP (Fig. 13).

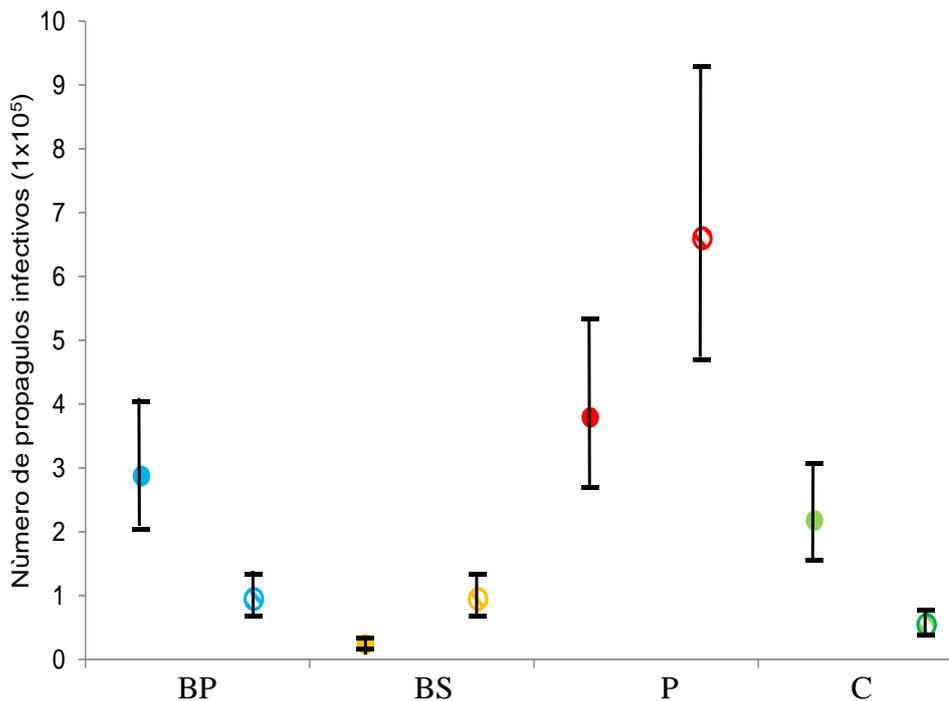


Figura 13. Número de propágulos infectivos, con barras de límite inferior y límite superior. ● Temporada de lluvias círculos relleno sólido. ◐ Temporada de secas círculos relleno trama.

6.3.2. Estimación del NMP con el programa Dilution

En ambas temporadas se presentó el mismo orden de mayor a menor número de propágulos infectivos: potrero (P) > (BS) > (BP) > (C). Además, a través de estos cálculos pude establecer diferencias significativas entre los diferentes usos de suelo, considerando como el límite mínimo el 15% de verosimilitud, que equivale al 0.05 de probabilidad de error (Sport 2000); si las curvas se tocan por debajo del 15%, o no se tocan, puede afirmarse que existen diferencias significativas entre las curvas; si se tocan por encima del 15%, no existen diferencias significativas (Fig. 14).

En promedio, durante la temporada de lluvias se estimó el valor más alto de número de propágulos ($13\ 593 \pm 10\ 986$), a diferencia de la temporada de sequía ($7\ 228 \pm 5\ 088$).

6.3.2.1. NMP en lluvias por cada uso de suelo

En la temporada de lluvias se formaron tres grupos, 1) P, con el máximo número de propágulos (46 435 en 50 g de suelo), 2) BS con (4 394 en 50 g de suelo) y BP con (3 448 en 50 g de suelo) y por último el grupo 3) cultivo con el menor número de propágulos (95 en 50 g de suelo) (Fig. 14).

6.3.2.2. NMP en secas por cada uso de suelo

En la temporada de sequía, también se formaron tres grupos: 1) P (21 912 propágulos en 50 g de suelo) y BS (6 237 en 50 g de suelo), 2) BP (745 en 50 g de suelo), y 3) C (17 en 50 g de suelo) (Fig. 14).

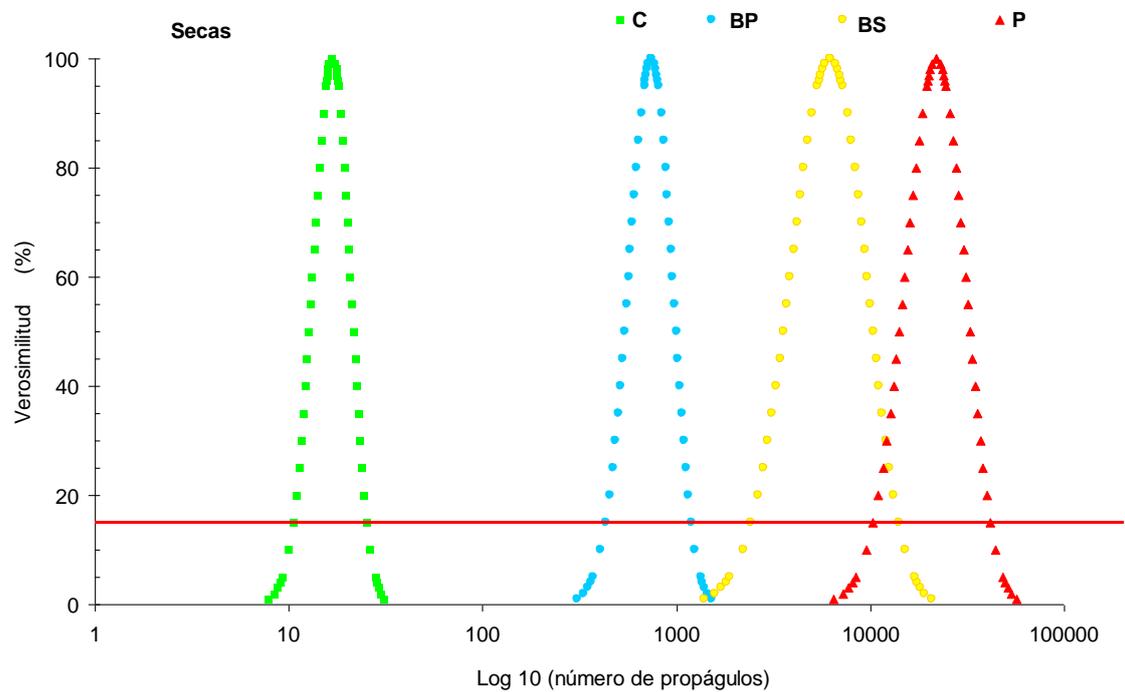
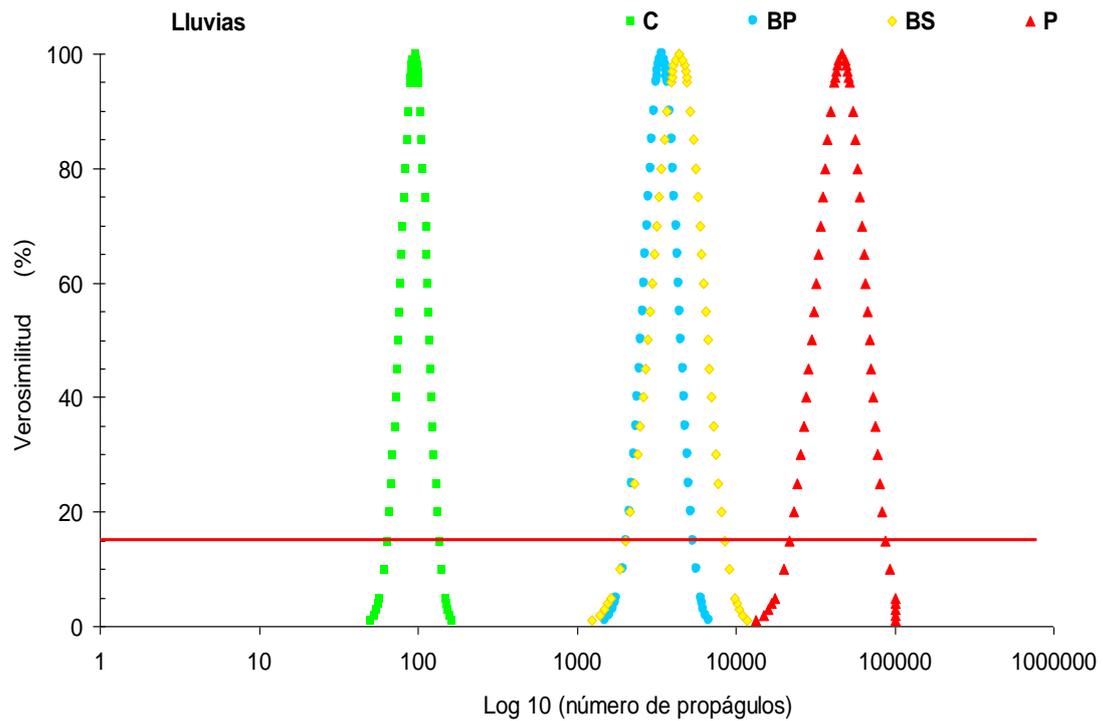


Figura 14. NMP. A) En temporada de lluvias potrero significativamente diferente de BS. B) En temporada de sequía BS es diferente significativamente de BP. Cultivo es diferente significativamente de de los tres usos de suelo en ambas temporadas.

6.4. Proporciones de la colonización en las diluciones

6.4.1. Temporada de lluvias

Las diluciones presentaron una tendencia de mayor a menor proporción, de la dilución "0" a la dilución "9", de presencia de raíces colonizadas, excepto en el cultivo (Fig. 15).

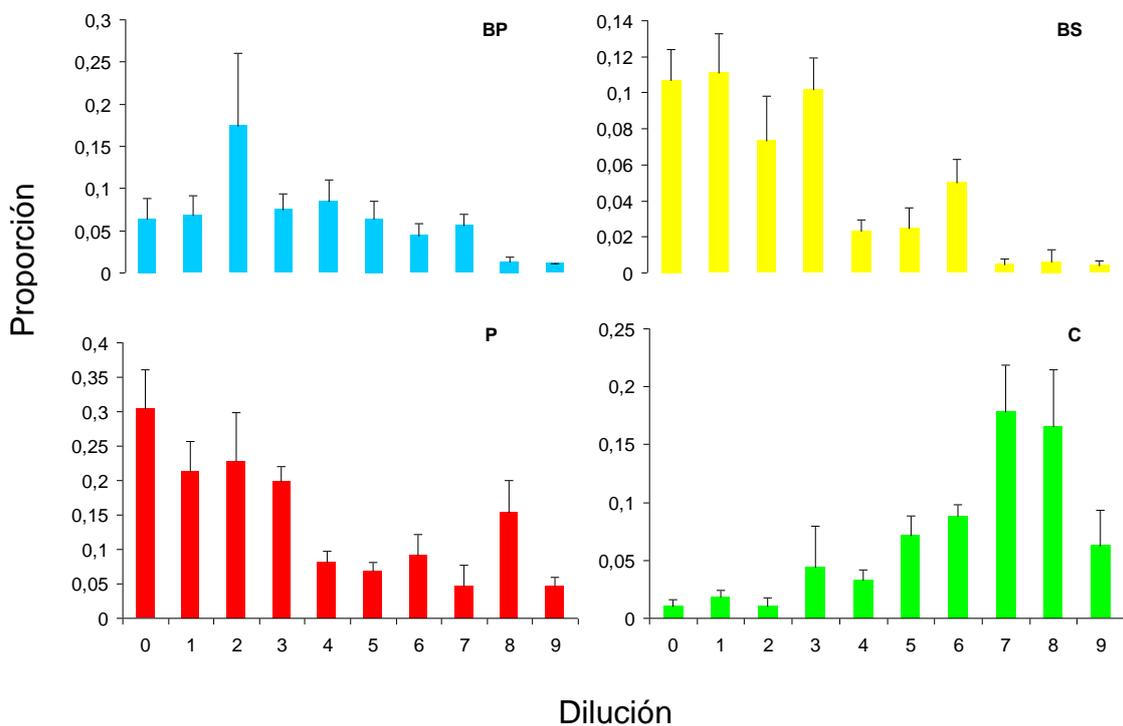


Figura 15. Proporción promedio del número de campos con presencia de estructuras de HMA (+1E.E.), en cada una de las diluciones, en la temporada de lluvias.

6.4.2. Temporada de sequía

En los usos de suelo de selva y acahual, la tendencia descendente en la proporción de la colonización es muy marcada, dilución "0" a dilución "9" (Fig. 16); aunque, en el cultivo se presenta de la misma forma, los valores

no varían mucho entre ellos; y lo mismo sucede en el caso del potrero, pero la tendencia es la misma que en los otros usos de suelo.

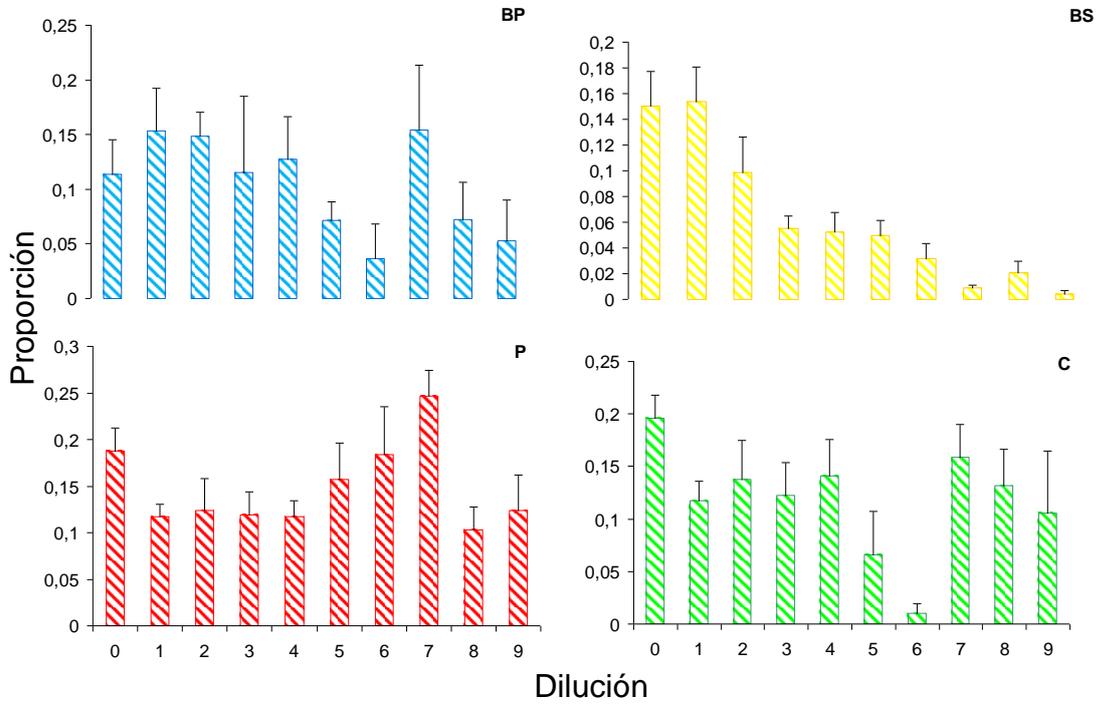


Figura 16. Proporción promedio del número de campos con presencia de estructuras de HMA (+1E.E.), en cada una de las diluciones, en la temporada de sequía.

7. Discusión

7.1. Porcentaje de colonización

En este estudio, comprobé la presencia de HMA en los cuatro usos de suelo analizados (bosque tropical perennifolio primario y secundario, potrero y cultivo), en la región de Los Tuxtlas, Veracruz, sin importar la temporalidad (lluvias y sequía); sin embargo, las variables medidas variaron en función del uso y de la temporada.

7.1.1. Temporada

En la temporada de lluvias, se ha reportado mayor porcentaje de colonización que en la temporada de sequía, dado que el mayor contenido de agua en el suelo favorece la germinación de esporas y, potencialmente, hay más micelio que puede colonizar nuevas raíces, de tal forma que la actividad micorrícica aumenta y esto, a su vez, está relacionado con una mayor actividad metabólica de las plantas al haber un aumento en la disponibilidad del agua (Núñez-Castillo y Álvarez-Sánchez 2003, Lugo *et al.* 2003, Cruz-Paredes 2013). Sin embargo, estos estudios se refieren a los porcentajes de colonización presentes en las raíces *in situ*; en el caso de mi bioensayo, ocurrió lo contrario; es decir, el suelo colectado durante la temporada de sequía generó un porcentaje de colonización promedio mayor, al que obtuve con el suelo colectado durante la temporada de lluvias; estos resultados son similares a los obtenidos por Allen (2001), donde encontró que en periodos de sequía, las raíces crecen mas lento, dando como resultado un alto porcentaje de colonización a diferencia del periodo de lluvias, donde el rápido crecimiento de raíces, produjo un bajo porcentaje de colonización.

En mi caso, el haber encontrado mayor porcentaje de colonización durante la temporada de sequía, podría estar relacionado con el hecho de que en esta temporada de muestreo, el suelo contuvo mayor número de esporas (Rodríguez-Galicia y González-Franco datos no publicados), que el de lluvias,

además de que algunas especies fúngicas pueden mantener la viabilidad de las hifas en condiciones de sequía en suelo sin disturbio, al menos, por un corto periodo (Jasper *et al.* 1989b).

Los bajos valores de colonización total correspondientes al suelo colectado durante lluvias, pueden estar relacionados con la menor producción de micelio en esta temporada (Cruz-Paredes 2013) y considerando que es la principal fuente de inóculo en bosques tropicales (Fischer *et al.* 1994, Aguilar *et al.* 2009), al verse afectada una de las fuentes de propágulos, también puede verse afectada la colonización intrarradical (Abbott y Robson 1991).

Resulta interesante destacar las diferencias del porcentaje de colonización por estructura y temporalidad, dado que el suelo colectado durante la temporada de sequía alcanzó a generar menos hifas pero más esporas en seis semanas; mientras que el proveniente de lluvias tuvo una mayor producción de hifas y muy pocas esporas, da lugar a diferentes hipótesis

Por un lado, es probable que las diferencias en esta respuesta funcional estén relacionadas con diferencias en la composición de especies de HMA, de tal forma que la presencia de especies que esporulan más (*Claroideoglossum etunicatum*, *Acaulospora kentinensis*, *Diversispora eburnea*, *F. verruculosum*) (Rodríguez-Galicia y González-Franco datos no publicados) es mayor durante la temporada de sequía que en lluvias. Por otro lado, durante la temporada de sequía las fuentes de inóculo pueden ser más variadas que las presentes en el suelo durante la temporada de lluvias, de esta forma, hay más esporas, parte del micelio sobreviviente, junto con gran cantidad de raíces colonizadas, asegurando la colonización de diferentes formas, a diferencia de la temporada de lluvias, donde abunda el micelio y las raíces colonizadas.

7.1.2. Porcentaje de colonización por uso de suelo

El suelo proveniente del potrero generó el mayor porcentaje de colonización total, a pesar de que éste uso de suelo puede ser considerado un sitio perturbado, si se compara con el bosque tropical perennifolio primario y secundario y, por lo mismo, se hipotetizó que generaría menor colonización (Brundrett 1991, McGonigle y Miller 2000, Jasper 1989b); sin embargo, esto puede estar relacionado con la planta trampa que se usó, en este caso fue

sorgo, especie vegetal perteneciente a las gramíneas (Poaceae), familia en la que se ha reportado un alto porcentaje de colonización (Read *et al.* 1976); también podría tratarse de una posible afinidad de las especies de HMA que se encuentran en el potrero por la planta trampa que se usó (Fischer *et al.* 1994), debido a que tanto las plantas hospederas que se encuentran en suelo de potrero y la planta trampa pertenecen a la misma familia, lo que implica un cambio en la composición de la comunidad de HMA del potrero con respecto a el bosque tropical primario o secundario (Picone 2000). Por lo que el porcentaje de colonización varía en función de la interacción planta-hongo micorrizógeno (Allen 2001).

El mayor porcentaje de colonización en potrero, también podría estar relacionado con lo que algunos autores plantean, es decir, que la colonización estará dada por y será una medida del número de propágulos, de tal forma que a mayor número de propágulos, mayor colonización (Carling *et al.* 1997, Guadarrama 2008, Padilla *et al.* 2004); en este sentido, las raíces de sorgo en suelo de potrero presentaron mayor número de propágulos colonizadores y que, además de hifas y esporas, también presentó otras estructuras que pueden funcionar como propágulos, vesículas y ovillos, aumentando la probabilidad de colonizar raíces. Por lo que, la combinación, mayor número de propágulos en las raíces de suelo de potrero aunado a la especie trampa empleada que en este caso fue sorgo, resultó en raíces con un elevado porcentaje de colonización.

El hecho de que en suelos de bosque secundario se haya encontrado mayor porcentaje de colonización que en suelos de bosque primario, puede estar relacionado con el estado sucesional; donde en estados tardíos de la sucesión y en bosques primarios, la vegetación es menos dependiente de los HMA (Janos 2007, Zangaro *et al.* 2000), lo cual también se ha visto reflejado en el menor número de propágulos encontrados (Ramos-Zapata *et al.* 2005). Los resultados obtenidos fueron los esperados con respecto al suelo proveniente de bosque primario, al tener valores más bajos en número de propágulos y en porcentaje de colonización, respecto a suelo de bosque secundario, tal y como lo han reportado Fischer *et al.* (1994) y Zangaro *et al.* (2000), en bosques tropicales.

El haber encontrado un bajo porcentaje de colonización total, al igual que un bajo porcentaje de colonización por hifas en suelos de cultivo, se puede atribuir al manejo del suelo, principalmente por la ruptura del micelio o por el uso de insumos químicos y la reducción del tiempo de barbecho, ya que disminuyen y pueden influir sobre el número de propágulos (Abbott y Robson 1991, Padilla *et al.* 2004, Sangabriel *et al.* 2010); cualquiera de los factores anteriormente mencionados, afecta el establecimiento de los HMA y, por lo tanto, la colonización de las raíces de las plantas hospederas (Jasper 1989b, Sieverding 1991, Brundrett 1991, Pattinson *et al.* 1999).

7.2. Potencial de inóculo

En ambas temporadas, al comparar el potencial de inóculo, en diferentes usos de suelo, se encontró que el potrero tuvo el mayor número de propágulos colonizadores; resultados similares han sido previamente reportados por Fischer *et al.* (1994).

El potencial de inóculo parte del supuesto de que a mayor número de propágulos, mayor colonización total (Zangaro *et al.* 2000). En nuestra zona de estudio, no se cumplió este supuesto en muchos de los casos. Se obtuvo el mayor número de propágulos durante la temporada de lluvias; sin embargo, en dicha temporada se encontró el menor porcentaje de colonización, por lo que no se pudo correlacionar el número de propágulos colonizadores con la colonización; excepto, cuando se trató de suelo proveniente de potrero en lluvias, en el cual sí se presentó una relación positiva entre porcentaje de colonización y potencial de inóculo.

En ambas temporadas, el suelo del potrero fue el que presentó el mayor número de propágulos. De tal forma que el potencial de inóculo podría estar influenciado por la identidad de los hongos, y el número de propágulos que tenga (Janos, 1980b), así como de la fuente de inóculo (Kiers *et al.* 2000), el cual se ha considerado como una estrategia para la colonización ante la tolerancia al disturbio; por ejemplo, *Gigaspora* y *Scutellospora* son HMA exitosos colonizando mediante esporas, viéndose un poco limitada su colonización mediante fragmentos de raíz; mientras que *Glomus* y *Acaulospora*, pueden colonizar mediante todo tipo de inóculo (Klironomos

2002). Aumentando la posibilidad que si un tipo de propágulo no es exitoso, tiene otros para poder establecer la relación.

El haber tenido mayor número de propágulos en suelo de potrero, pudo haber generado mayor colonización en las raíces de este suelo. A diferencia de los otros tres usos de suelo, principalmente suelo de cultivo dónde, se pudo comprobar que el las practicas de manejo y el uso intensivo de químicos reduce el número de propágulos.

En bosques tropicales, se ha encontrado mayor potencial de inóculo donde comienza la sucesión que en el bosque tropical primario (Zangaro *et al.* 2000, Ramos-Zapata *et al.* 2011); estos datos coinciden con los que se obtuvieron en este estudio, donde se encontró mayor número de propágulos en suelo de bosque secundario y menor número en suelo de bosque primario; básicamente, esto está relacionado con las características de historia de vida de las plantas, dado que aquellas especies vegetales que crecen en el bosque primario tienden a ser micorrícicas facultativas con los HMA, su translocación de carbono y sostenimiento de la relación es muy pobre (Zamarripa *et al.* 2013), por lo que es de esperarse que el número de esporas, la cantidad de micelio y raíces colonizadas sea mucho menor que en el caso de especies dominantes en los bosques secundarios; o sea, que especies secundarias presentan una mayor afinidad a los HMA, y dependen más de ellos para su desarrollo y captura de nutrientes (Siquiera *et al.* 1998, Álvarez-Sánchez *et al.* 2009).

La estacionalidad también tuvo un efecto sobre el potencial de inóculo, siendo mayor durante la temporada de lluvias; ello puede estar relacionado con el potencial hídrico, el cual podría estar influenciando la supervivencia de los propágulos (Miller *et al.* 1985). Sin embargo, en ambientes más claramente estacionales, como un bosque seco estacional, no se encontró un efecto de la temporada sobre el potencial de inóculo; aunque, sí se registró mayor número de propágulos en la temporada de sequía, argumentando que la respuesta de los HMA a la temporalidad no tiene fuerte efecto como lo tiene el tiempo de abandono (Guadarrama *et al.* 2014).

7.3. El método

Es posible que especies de HMA formen propágulos viables en campo; mientras que bajo condiciones de invernadero no y viceversa; alterando su colonización en el bioensayo, debido a que éste podría permitir las condiciones necesarias para la activación de algunos propágulos que podrían no colonizar en condiciones de campo (Adelman y Morton 1986). Con relación a esto, es probable que el potrero haya tenido el mayor número de propágulos en ambas temporadas, por que las esporas pudieran ser la principal fuente de propágulo en el bioensayo (Fisher *et al.* 1994), teniendo en cuenta la forma de obtener el suelo a evaluar.

Lo mismo ocurre con la planta trampa, siendo probable que exista afinidad entre las especies de HMA que se encuentran en el suelo del potrero y las raíces de las plántulas de sorgo. En este caso, podría sugerir para próximos estudios, llevar a cabo el bioensayo con una especie vegetal de la región que sea micotrófica y de manera conjunta con otra especie de las que ya han sido probadas en este método, y así compararlas y poder descartar una probable afinidad

7.4. Probabilidad de colonización por diluciones

Partiendo del supuesto “conforme el suelo está más diluido, se puede encontrar menor porcentaje de colonización” (Zangaro *et al.* 2000), la probabilidad de colonización, en función de la dilución, estuvo inversamente relacionada en la mayoría de los casos; excepto, en el suelo de cultivo de la temporada de lluvias, donde, en lugar de disminuir, la colonización fue aumentando, lo cual se puede atribuir a que hubo contaminación de macetas de las últimas diluciones.

8. Conclusiones

Los resultados sugieren que la temporalidad y el cambio de uso de suelo y sus prácticas de manejo, influyen sobre el número de propágulos y sobre el porcentaje de colonización en los diferentes usos de suelo evaluados.

El mayor porcentaje de colonización total por hongos micorrizógenos arbusculares (HMA), se encontró en secas.

El mayor porcentaje de colonización por estructuras, fue el de hifas.

Se encontró mayor porcentaje de colonización por hifas en temporada de lluvias, y mayor colonización por esporas en temporada de sequía.

El mayor número de propágulos se encontró en la temporada de lluvias.

El potrero, fue el uso de suelo con el mayor número de propágulos y, mayor porcentaje de colonización.

El cultivo fue el uso de suelo con el menor número de propágulos y porcentaje de colonización.

9. Literatura citada

- Abbott L.K. y Robson A.D. 1981. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum. *Australian Journal of Agricultural Research*, 32: 631–639.
- 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 mycorrhizal fungi: Influence of host-soil diluent combinations on MPN estimates and percentage colonization, *Soil. Biology and Biochemistry*, 18: 7–13.
- Addy H. D., Miller M. H. y Peterson R.L. 1997. Infectivity of the propagules associated with extraradical mycelia of two AM fungi following winter freezing. *New Phytologist*, 135: 745-753.
- Aguilar-Fernández M., Jaramillo V. J., Varela-Fregoso L. y Gavito M. E. 2009. Short-term consequences of slash-and-burn practices on the arbuscular mycorrhizal fungi of a tropical dry forest. *Mycorrhiza*, 19: 176-186.
- Allen M. F. 2001. Modeling Arbuscular mycorrhizal infection: is % infection an appropriate variable?. *Mycorrhiza*, 10: 255-258.
- Álvarez-Sánchez J., Sánchez-Gallen I., y Guadarrama P. 2009. Analyses of Ecophysiological Traits of Tropical Rain Forest Seedlings under Arbuscular Mycorrhization: Implications in Ecological Restoration. En: Varma A. y Kharkwal A. C. (Eds). *Symbiotic fungus: principles and practice*. Springer Berlin Heidelberg, 293-305 pp.
- Alvarez-Santiago S. A., García-Oliva F., y Varela, L. 1996. Analysis of vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization data with a logistic regression model. *Mycorrhiza*, 6: 197-200.
- Bagyaraj J. D. y Stumer S. L. 2012. Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). En: Moreira F., Huising E. J. y Bignell D. E. (Eds). *Manual de*

- biología de suelos tropicales: muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo. Instituto Nacional de Ecología, México, 337 pp.
- Bierman B. y Linderman R. G. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New phytologist*, 95: 97-105.
- Bonfante P. y Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1-11.
- Brundrett M. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in ecological research*, 21: 171-313.
- 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. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79: 473-495.
- 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., Laborde J. y Sánchez-Ríos G. (Eds.). Los Tuxtlas. El Paisaje de la Sierra. Instituto de Ecología, A. C., Veracruz, México. pp. 231-270.
- CONANP. 2007. Protocolo para la evaluación del uso del suelo y vegetación en Áreas Naturales Protegidas Federales de México. México, D.F.
- CONANP. 2011. Actualización de la tasa de cambio del uso del suelo en La Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas (Informe Final). Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Dirección Regional Planicie Costera y Golfo de México. México, D.F.
- Cruz-Paredes C. 2013. Cuantificación de la colonización intraradical y extraradical de hongos micorrizógenos arbusculares en un mosaico

heterogéneo en el trópico seco de Veracruz. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 106 pp

Cuenca G. y Lovera M. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in disturbed and revegetated sites from La Gran Sabana, Venezuela. *Canadian Journal of Botany*, 70: 73-79.

Cuenca G., De Andrade Z., Lovera M., Fajardo L., Meneses E., Márquez M. y Machuca R. 2003. Pre-selección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de la gran sabana, Estado Bolívar, Venezuela. *Ecotropicos* 16: 27-40.

Cuenca G. 2015. Las micorrizas arbusculares: aspectos teóricos y aplicados. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. 432 pp.

Das A. y Varma A. 2009. Symbiosis: The Art of the Living. En: Varma A. y Kharkwal A. C. (Eds). *Symbiotic fungus: principles and practice*. Springer pp.

Dodd J. C., Arias I., Koomen I. y Hayman D. S. 1990. The management of populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a savana ecosystem. *Plant and soil*, 122: 241-247.

Fischer C. R., Janos D. P., Perry D. A., Linderman R. G. y Sollins P. 1994. Mycorrhiza inoculum potentials in tropical secondary succession. *Biotropica*, 26: 369-377.

García I., Mendoza R. y Pomar M.C., 2008. Deficit and excess of soil water impact on plant growth of *Lotus tenuis* by affecting nutrient uptake and arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 304: 117–131.

Gavito M. E., Curtis P. S., Mikkelsen T. N. y Jakobsen I. 2000. Atmospheric CO₂ and micorrhiza effects on biomass allocation and nutrient up take of

nodulated pea (*Pisum sativum* L.) plant. *Journal of experimental Botany*, 51: 1931-1938.

Genre A. y Bonfante P. 2012. The Interface Between Plants and Mycorrhizal Fungi: Nutrient exchange, signaling and cell organization. En: Esser K. (Eds.). *The mycota, a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research, Fungal Associations IX 2nd*. Springer Berlin Heidelberg, 39-50 pp.

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

Guadarrama-Chávez P. 2008. Diversidad y funcionalidad de los hongos micorrizógenos arbusculares en comunidades secundarias de selva baja caducifolia. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 78 pp.

Guadarrama P., Castillo S., Ramos-Zapata J.A., Hernández-Cuevas L.V, y Camargo-Ricalde S.L. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in changing environments: The effects of seasonality and anthropogenic disturbance in a seasonal dry forest. *Pedobiologia Journal of Soil Ecology*, 57: 87-95.

Harrier L.A. y Watson C.A. 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Management science*, 60, 149–157.

Janos D. P. 1980a. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. *Ecology*, 61: 151-162.

Janos D. P. 1980b. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica*, 12: 56-64.

Janos, D.P. 2007. Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 17:75-91.

- Jasper D. A., Abbott L. K. y Robson A. D. 1989b. Hyphae of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus maintain infectivity in dry soil, except when the soil is disturbed. *New Phytologist*, 112: 101-107.
- Jasper D. A., Aabbott 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.
- Jeffries P. y Barea J.M. 2012. Arbuscular mycorrhiza: A key Component of sustainable plant-soil ecosystems En: Esser K. (Eds.). The mycota, a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research, Fungal Associations IX 2nd. Springer Berlin Heidelberg, 51-76 pp.
- Johnson N. C., Zak D. R., Tilman D. y Pfleger F. L. 1991. Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. *Oecología*, 86: 349-358.
- Johnson N. C. Graham J. H. y Smith F. A. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, 135: 575-585.
- Johnson N. C., O'Dell T. E. y Bledsoe C. S. 1999. Methods for ecological studies of mycorrhizae. En: Robertson, G. P., Bledsoe C. S., Coleman D. G. y Sollins P. (Eds). Standard soil methods for long-term ecological research. Oxford University Press, New York, 378-411pp.
- 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.
- Kjöller R., Rosendahl S., 2000. Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biology and Fertility of Soils*, 31: 361–365.

- Klironomos J. N. y Hart M. M. 2002. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza*, 12: 181-184.
- Korb J. E., Johnson N. C. y Covington W.W. 2003. Arbuscular mycorrhizal propagule densities respond rapidly to ponderosa pine restoration treatments. *Journal of Applied Ecology*, 40: 101-110.
- Lot-Helgueras A. 1976. La Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas: pasado, presente y futuro. En: Gómez-Pompa A., Vázquez-Yanes C., Del Amo S., y Butanda A. (Eds.). Investigaciones sobre la Regeneración de Selvas Altas en Veracruz , México. Cía. Editorial Continental, México. 31-69 pp.
- Lugo M. A., González Maza M. E. y Cabello M. N. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in a mountain grassland II: Seasonal variation of colonization studied, along with its relation to grazing and metabolic host type. *Mycología*, 95: 407-415.
- Luna-González W. B. 2009. Estructura y potencial de inóculo de hongos micorrizógenos arbusculares en fragmentos de diferentes tamaños de selva alta perennifolia. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 93 pp.
- McGonigle T. P. y Miller M. H. 2000. The inconsistent effect of soil disturbance on colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi: a test of the inoculum density hypothesis. *Applied Soil Ecology*, 14: 147–155.
- McGonigle T. P., Miller M. H., Evans D. G. Fairchild G. L. y Sean J. A. 1990. A new method wich gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115: 495-501.
- Miller R. M., Carnes B. A y Moorman T. B. 1985. Factors influencing survival of vesicular-arbuscular mycorrhiza propagules during topsoil storage. *Journal of Applied Ecology*, 22: 259-266.

- Nuñez-Castillo O. y Álvarez-Sánchez F. J. 2003. Arbuscular mycorrhizae of the palm *Astrocaryum mexicanum* in disturbed and undisturbed stands of a Mexican tropical forest. *Mycorrhiza*, 13: 271-276.
- Oehl F., Sieverding E., Palenzuela J., Ineichen K. y Alves da Silva G.. 2011. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA: Fungus*, 2: 191-199.
- Ortega-Larrocea M.P., Siebe C., Estrada A., Webster R. 2007. Mycorrhizal inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi in soils irrigated with wastewater for various lengths of time, as affected by heavy metals and available P. *Applied Soil Ecology*, 37: 129-138.
- Padilla S. P. J., Benjumea J. M. S. y orio Vega N. W. O. 2004. Potencial simbiótico y efectividad de hongos micorrizo-arbusculares de tres suelos sometidos a diferentes usos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*, 57: 2203.
- Pattinson G. S., Hammill K.A., Sutton B.G. y Mcgee P. A. 1999. Simulated fire reduces the density of arbuscular mycorrhizal fungi at the soil surface. *Mycological Research*, 103: 491-496.
- 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 of the British Mycology Society*, 55: 158-161.
- Picone C. 2000. Diversity and abundance of arbuscular-mycorrhizal fungus spores in tropical forest and pasture. *Biotropica*, 32: 734-750.
- 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.
- Porter W. M., Robson A. D. y Abbott L. K. 1987. Factors controlling the distribution of vesicular mycorrhizal fungi in relation to soil pH. *Journal of Applied Ecology*, 24: 663-672.

- Ramos-Zapata J. A., 2005. Ecofisiología de la simbiosis micorrícica en la palmera nativa de la península de Yucatán *Desmoncus orthacanthos* Martius. Tesis de Doctorado en Ciencia y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán, México. 73 pp.
- Ramos-Zapata J. A., Guadarrama P. y Navarro J. A. 2008. Estimación del número de propágulos infectivos de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). En: Álvarez-Sánchez J. y Monroy-Ata A. (Eds.). Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Las prensas de ciencias, 17-27 pp.
- Ramos-Zapata J. A., Guadarrama P., Navarro-Alberto J. y Orellana R. 2011. Arbuscular mycorrhizal propagules in soils from a tropical forest and an abandoned cornfield in Quintana Roo, Mexico: visual comparison of most-probable-number estimates. *Mycorrhiza*, 21: 139-144.
- Read D. J, Koucheiki H. K. y Hodgson J. 1976. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. The occurrence of infection *New Phytologist*, 77: 641-653.
- Read D.J. 1991. Mycorrizas in ecosystems. *Experientia*. 47:376-391.
- Remy W., Taylor T. N., Hass H. y Kerp H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 11841-11843.
- Romero-Martínez J. A. 2009. Evaluación del número de propágulos viables de hongos micorrizógenos arbusculares en la región de Nizanda (Oaxaca) México. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 72 pp.
- Sangabriel-Conde W., Trejo-Aguilar D., Soto-Estrada A., Ferrera-Cerrato R. y Lara-Capistrán L. 2010. Potencial de colonización de hongos micorrícico-arbusculares en suelos cultivados con papayo bajo diferentes manejos de producción. *Revista Mexicana de Micología*, 31: 45-52.

- Schalamuk S. y Cabello M. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: possible effects on Glomeromycota diversity. *Mycología*, 102: 261-268.
- Siddiqui Z. A. y Pichtel J. 2008. Mycorrhizae: an overview. En Siddiqui Z. A., Akhtar M. S. y Futai K. (Eds.). *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*, Springer, Berlin, 1-35 pp.
- Sieverding E. 1990. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 29: 369-390.
- Sieverding E. Friedrichsen J. y Suden W. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. GTZ, Eschborn, Germany, 371 pp.
- Siqueira J. O., Carbone M. A., Curi N., da Silva S. C. y Davide A. C. 1998. Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to sucesional groups in Southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*, 107: 241-252.
- Smith S.E. y Read D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd ed. Academic Press, Londres, UK. 605 pp.
- Soto M. 2004. El Clima. En: Guevara, S., J. Laborde, y G. Sánchez-Rios (Eds.). *Los Tuxtlas: El paisaje de la sierra*. Instituto de Ecología A. C. Veracruz, México. pp. 85-109.
- Spatafora J. W., Benny G. L., Berbee M. L., Bonito G., Corradi N., Grigoriev I., Gryganskyi A., James T. Y., O'Donnell K., Roberson R. W., Taylor T. N., Uehling J., White M. M. y Stajich J. E. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108: 1028-1046.
- Soudzilovskaia N. A., Douma J. C., Akhmetzhanova A. A., Bodegom P. M., Cornwell W. K., Moens E. J., Treseder K. K., Tibbett M., Wang Y., Cornelissen J. H. C. 2015. Global patterns of plant root colonization

intensity by mycorrhizal fungi explained by climate and soil chemistry. *Global Ecology and Biogeography*, 24: 371-382.

StatSoft Inc. 2000. STATISTICA for Windows (programa de cómputo manual).

Tester M., Smith S. E., Smith F. A. y Walker N. A. 1986. Effects of photon irradiance on the growth of infection units in *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist*, 103: 375-390.

Tommerup I. C. 1983. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil.

Treseder K. K. y Allen M. F. 2002. Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: A model and Field Test. *New Phytologist*, 155: 507-515.

van Aarle I. M., Olsson P. A. y Söderström B. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization. *New Phytologist*, 155: 173-182.

van der Heijden M. G. A. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi as a determinant of plant diversity: in search of underlying mechanisms and general principles. *Ecological Studies* 157: 243–265.

Zamarripa N., Patterson A. M., Sánchez-Gallen I. y Álvarez-Sánchez J. Crecimiento de plántulas de especies de la selva húmeda inoculadas con los hongos micorrizógenos arbusculares: un análisis del efecto del tamaño del fragmento. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16: 377-389.

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

Apéndice 1

Bioensayo. Se requiere de un sustrato previamente esterilizado antes de montar el bioensayo. Esterilicé a 90°C durante una hora por dos días consecutivos, en mi caso esterilicé arena fina (35 kg) y arena sílica (35 kg), posteriormente se hizo una mezcla 1:1.

1. Lavé las semillas de sorgo con agua corriente y las desinfecté durante 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 10%; posteriormente puse a germinar aproximadamente 500 semillas de sorgo durante una semana en cajas de plástico sobre una cama de algodón como sustrato, posteriormente trasplanté las plántulas (dos en cada vasito, en caso de que una no sobreviviera, estaba la otra), procurando que la raíz estuviera en contacto con el suelo diluido.

2. Muestra compuesta del suelo a evaluar. Tamicé con un tamiz cuya apertura era de 1mm de las 25 muestras extraídas para cada uso de suelo, de cada muestra pesé 100 g, teniendo un total de 2 500 g para cada uso de suelo, del cual únicamente usé 300 g para hacer las diluciones de cada uno.

3. En vasos de 300 g, primero se coloqué 200 g arena estéril, luego 50 g de dilución del suelo y al final 50 g de arena estéril para evitar que la dilución del suelo se contaminara con el exterior.

La preparación de las diluciones las hice de la siguiente forma:

4^0 (suelo sin diluir)

4^{-1} (250 g de arena estéril, 75 g de suelo sin diluir a evaluar)

4^{-2} (250 g de arena estéril, 75 g de dilución 4^{-1})

4^{-3} (250 g de arena estéril, 75 g de dilución 4^{-2})

4^{-4} (250 g de arena estéril, 75 g de dilución 4^{-3})

4^{-5} (250 g de arena estéril, 75 g de dilución 4^{-4})

4^{-6} (250 g de arena estéril, 75 g de dilución 4^{-5})

4^{-7} (250 g de arena estéril, 75 g de dilución 4^{-6})

4^{-8} (250 g de arena estéril, 75 g de dilución 4^{-7})

4^{-9} (250 g de arena estéril, 75 g de dilución 4^{-8})

4. El riego lo hice cada tercer día durante seis semanas; en la primer semana se regó con una solución nutritiva (solución nutritiva de Hoagland baja en fósforo) en ambas temporadas.

5. Transcurridas seis semanas, levanté el bioensayo para cosechar únicamente las raíces que se encontraban en contacto con el suelo a evaluar (Figura A1.1).



Figura (A1.1). Letra A. Muestra en el recuadro la región de donde únicamente tomé las raíces para teñir. Letra B. Rejilla histológica con raíces cortadas antes de la tinción; se aprecia en la parte inferior la región donde etiqueté las rejillas en este caso (Pot 1) abreviatura de Potrero, dilución 1.

6. Enjuagué las raíces de las plántulas con agua corriente y las corté, posteriormente las coloqué en rejillas histológicas previamente etiquetadas (Figura A1.1). Para posteriormente teñirlas.

7. Para estimar el potencial de inóculo por el método del número más probable usé las preparaciones de las diluciones 1 a la 9, indicando solamente presencia o ausencia de estructuras fúngicas, aplicando el mismo método de lectura como se muestra en la figura anterior (tracé cuatro líneas imaginarias atravesando las raíces) (Fig. A 1.2), observado 100 campos aproximadamente por laminilla.

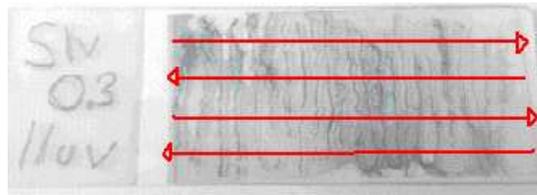


Figura A1.2. Muestra una preparación con las raíces fijadas y las flechas indican el sentido en que se hace la lectura (se inicia de izquierda a derecha), así como las 4 líneas imaginarias que se hacen para observar a microscopio.

Apéndice 2.

Solución nutritiva de Hoagland

La solución nutritiva de Hoagland. Preparé 18 litros con las siguientes sustancias y sus respectivas cantidades:

Sustancia	Cantidad para 1 l	Cantidad para 18 l
-----------	-------------------	--------------------

KNO ₃	1.02 g/l	18.36 g/l
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.492 g/l	8.856 g/l
NH ₄ H ₂ (PO ₄)	1mg/l	18 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.49 g/l	8.82 g/l
H ₃ BO ₃	2.86 mg/l	51.48 mg/l
MnCl ₂ ·2H ₂ O	1.81 mg/l	32.58 mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08 mg/l	1.44 mg/l
ZnSO ₄ ·5H ₂ O	0.22 mg/l	3.96 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.09 mg/l	1.62 mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.5%	0.6 ml	10.8 ml

La cantidad de NH₄H₂ (PO₄) fue modificada para que se tuviera a una concentración de una parte por millón.

Apéndice 3

Tinción de las raíces de acuerdo a la técnica de Philips y Hayman (1970)

1. Lavé las raíces con agua corriente.
2. Coloqué las raíces en celdas histológicas.
3. Las introdujé en hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta que las raíces tomen una consistencia flexible y se tornen claras
4. En caso de que presentaran suberización o taninos (coloración café-rojiza), agregar agua oxigenada (H_2O_2) al 3% por 10 minutos y lavar con agua corriente. No fue mi caso
5. Agregué ácido clorhídrico (HCl) al 10% por 5 minutos, eliminé el exceso sin lavar con agua.
6. Coloqué las raíces en una solución de azul de tripano al 0.05% con lactoglicerol (agua: glicerina ácido láctico, 1:2:1) y las dejé reposar por 24 hrs, después cambiarlas a una solución de lactoglicerol, donde se almacenan hasta su montaje.

Apéndice 4

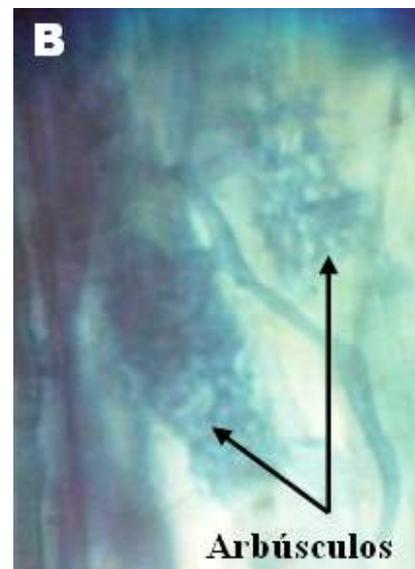
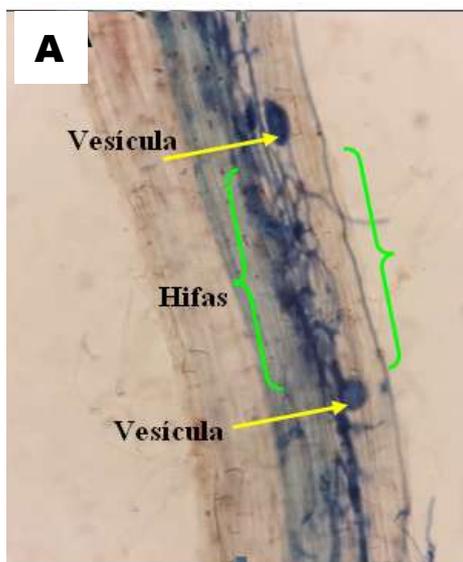
Técnica de estimación de la colonización micorrícica (Mc Gonigle *et al.* 1990)

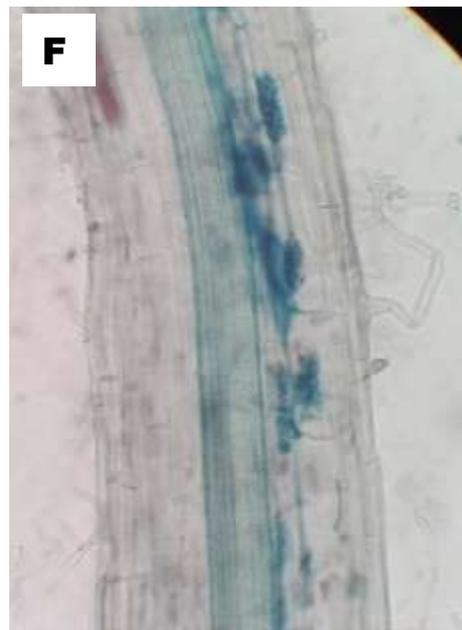
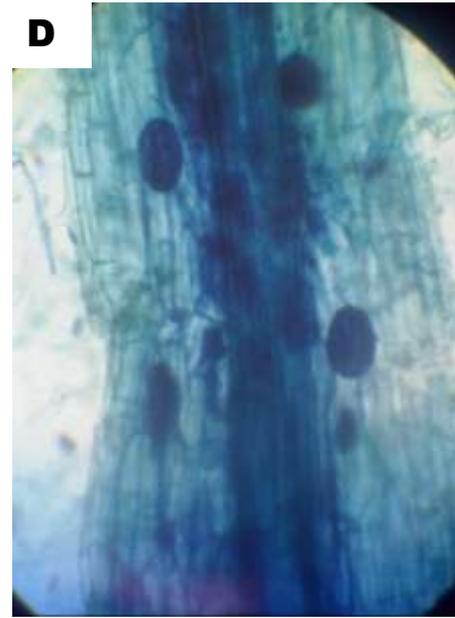
Para observar las raíces las monté en portaobjetos, uno por cada réplica, cada portaobjetos con 30 segmentos de 2 cm de largo aproximadamente y las fijé con alcohol polivinílico, siendo un total de 200 preparaciones para la temporada de sequía, 50 por cada uso de suelo.

Para estimar el porcentaje de colonización por estructura y total (sólo para la dilución "0").

Realicé la observación bajo microscopio óptico a 200 aumentos, en las preparaciones del control "0" y observé aproximadamente 100 campos por preparación, tomando en cuenta presencia de esporas, hifas, ovolos, arbuscúlos o ausencia (Fig. A4.1).

Estructuras observadas bajo microscopio





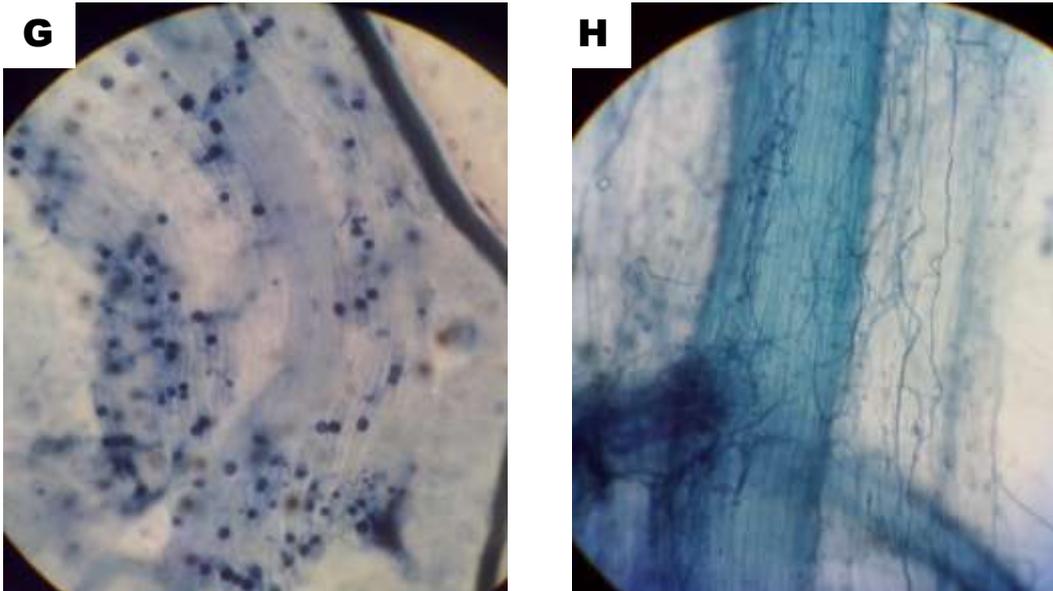


Figura A4.1. Raíz de *Sorghum vulgare* L. Observada bajo microscopio óptico A) Se observa la hifa a lo largo de la raíz y se vesículas en su interior (200 aumentos). B) Se observan dos arbusculos (1000 aumentos). C) y D) Vesículas e hifas (400 aumentos). E) y F) Se observan arbusculos a lo largo de la raíz e hifas (200 aumentos). G) Se observan esporas (200 aumentos). H) Hifas a lo largo de la raíz (200 aumentos). Fotografías por I. Cervantes 2016.

